

539,560

2)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004年7月8日 (08.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/056990 A1(51) 国際特許分類: C12N 9/88,  
15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 13/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016014

(22) 国際出願日: 2003年12月15日 (15.12.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-368360  
2002年12月19日 (19.12.2002) JP  
特願 2003-379280  
2003年11月10日 (10.11.2003) JPかおり (MATOISHI, Kaori) [JP/JP]; 〒297-0017 千葉県  
茂原市 東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内 Chiba (JP).  
伊藤 潔 (ITO, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒299-0265 千葉県 袖ヶ  
浦市 長浦 5 8 0-3 2 三井化学株式会社内 Chiba (JP).  
小林 英樹 (KOBAYASHI, Hideki) [JP/JP]; 〒297-0017 千  
葉県 茂原市 東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内 Chiba  
(JP). 田中英司 (TANAKA, Eishi) [JP/JP]; 〒299-0265 千  
葉県 袖ヶ浦市 長浦 5 8 0-3 2 三井化学株式会社内  
Chiba (JP). 及川 利洋 (OIKAWA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒  
297-0017 千葉県 茂原市 東郷 1 1 4 4 三井化学株式  
会社内 Chiba (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CN, DE, GB, ID, KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三井化  
学株式会社 (MITSUI CHEMICALS, INC.) [JP/JP]; 〒  
105-7117 東京都 港区 東新橋一丁目5番2号 Tokyo  
(JP).

規則4.17に規定する申立て:

— USのための発明者である旨の申立て (規則  
4.17(iv))

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 八巻 俊文 (YA-  
MAKI, Toshifumi) [JP/JP]; 〒297-0017 千葉県 茂原市  
東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 番場 伸  
一 (BANBA, Shinichi) [JP/JP]; 〒297-0017 千葉県 茂原  
市 東郷 1 1 4 4 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 的 石

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL NITRILE HYDRATASE

(54) 発明の名称: 新規なニトリルヒドラターゼ

(57) Abstract: It is aimed at providing the amino acid sequence of a nitrile hydratase having a novel mutation point and the base sequence of the gene. It is also aimed at providing a method of modifying an enzyme having a nitrile hydratase activity. As a means of achieving the above objects, the amino acid sequence of a mutant, which is obtained by transferring a novel mutation into a *Pseudonocardia thermophila* JCM3095-origin nitrile hydratase consisting of two types of hetero subunits, and the base sequence of the gene are provided. Further, the nitrile hydratase is modified by specifying the region to be modified in the stereostructure and/or the amino acid sequence in the nitrile hydratase and altering (substituting, inserting, deleting, etc.) the amino acids corresponding to the amino acid residues constituting the above region. Thus, a nitrile compound can be efficiently converted into the corresponding amide compound, compared with the existing techniques.(57) 要約: 本発明は新規な変異点を有するニトリルヒドラターゼのアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列を提供することを課題とし、また、ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の改変方法を提供することをも課題としている。上記課題を解決する手段として、シュードノカルディア・サーモフィラ *Pseudonocardia thermophila* JCM3095由来であり、ヘテロな2種のサブユニットから構成されるニトリルヒドラターゼに新規な変異を導入し、得られる変異体のアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列を提供する。更に、改変の対象となる領域をニトリルヒドラターゼ中の立体構造/アミノ酸配列中に特定し、該領域を形成するアミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸に置換・挿入・削除等の変更を加える事によってニトリルヒドラターゼを改変する。本発明により、ニトリル化合物を対応するアミド化合物に、従来技術に比して効率良く変換することが可能となる。

WO 2004/056990 A1

## 明細書

## 新規なニトリルヒドラーゼ

## 技術分野

本発明は、新規なニトリルヒドラーゼ及びそれをコードする遺伝子、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株、該細胞株を用いてニトリルヒドラーゼを産生する方法、及び該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法に関する。

また本発明は、ニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素の性質を改変する方法に関するものである。また、本発明は性質が改変された酵素、及びそれをコードする遺伝子、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株、該細胞株を用いてニトリルヒドラーゼを産生する方法、及び該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法に関する。本発明は、生体触媒を用いた物質生産の分野に於いて有用である。

## 背景技術

種々の化合物のニトリル基を水和によりアミド基に変換するニトリル水和活性を有する酵素であるニトリルヒドラーゼが発見され、該酵素を産生する微生物株が多数開示されている。ニトリルヒドラーゼを用いてニトリル化合物よりアミド化合物を工業的に製造するためには、アミド化合物の製造コストに占める該酵素の製造コストを下げるのが重要である。具体的には、酵素調製物の単位重量あたりの該酵素含有量を高くする必要がある。そこで、該酵素の遺伝子を用いて遺伝子工学の手法により該酵素を大量に発現させることを目的として、該酵素の遺伝子をクローニングする試みがなされている。

ニトリルヒドラターゼ活性を有する微生物としては、ロドコッカス ロドクロウス J-1 株（ブタペスト条約に則って、受託番号 FERM BP-1478 として茨城県つくば市東一丁目一番一号中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。）やシュードノカルディア サーモフィラ（本菌株は、理化学研究所微生物系統保存施設（埼玉県和光市広沢2-1）に番号 JCM3095 として保管され、何人にも請求により自由に分譲される。また、ブタペスト条約に則って、受託番号 FERM BP-7379 として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託されている。）が見い出されている（特許文献1及び3参照）。

また、これらの株よりニトリルヒドラターゼが単離され、同酵素が、一般的に  $\alpha$  サブユニット及び  $\beta$  サブユニットと呼ばれる2種類のポリペプチドを構成要素としている事が確認されている。そして、これらの株よりニトリルヒドラターゼ遺伝子が単離され、そのアミノ酸配列及び塩基配列が明らかにされた。更に、これらのニトリルヒドラターゼを形質転換体内で発現できるプラスミド及び同プラスミドにより形質転換された細胞株（例として TG1/pNHJ10H 及び MT-10822：これらはブタペスト条約に則って、前者は受託番号 FERM BP-2777 として独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに寄託され、後者は受託番号 FERM BP-5785 として、茨城県つくば市東一丁目一番一号中央第6の独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに1996年2月7日付けにて寄託されている。）が作出された。加えて、これらの細胞株によるニトリルヒドラターゼの生産及び該細胞株又はそれより得られるニトリルヒドラターゼをニトリル化合物と接触させる事による対応するアミド化合物の製造が可能となっている。（特許文献2及び4、非特許文献1参照）

また、ニトリルヒドラターゼの立体構造を解析する試みもなされており、その解析結果は、PDB番号 1AHJ、2AHJ、1IRE として公開されている。該酵素は、 $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットが会合した2量体がその基本構造単位となっており、その2量体が更に会合して4量体や8量体、12量体（由来となる生物種によって異なる。）を形成してその活性を発揮している事が明らかとなっている。更に、その活性中心を形成する領域や構造も明らかになっており、

活性中心は、反応溶媒に直接接触する酵素外側に露出した位置ではなく、酵素内部に包埋される様な位置に存在する事が知られている。活性の発揮に必須である金属原子（コバルト原子又は鉄原子：由来となる生物種によって異なる。）の活性中心への配位の様子も知られており、金属原子の配位に伴う現象として、活性中心を形成する領域を成すアミノ酸配列中のシステイン残基が翻訳後酸化を生じる事も明らかになっている。具体的には、 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の  $X_1 C X L C_1 S C_2 X_2 X_3 X_4 X_5$ （Cはシステインを、Xはセリン又はスレオニンを、Lはロイシンを、 $C_1$ はシステインスルフィ尼克酸（CYSTEINE SULFINIC ACID・3-SULFINOALANINE）を、Sはセリンを、 $C_2$ はシステインスルフェン酸（CYSTEINE SULFENIC ACID・S-HYDROXY-CYSTEINE）を、 $X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot X_4 \cdot X_5$ は任意のアミノ酸を示す。）という配列で表される領域が活性中心への金属原子の配位を担う領域とされている。（非特許文献2から4参照）

しかし、ニトリルヒドラーターゼ本来の活性は損なう事無く、活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性等の性質を改変する方法に関しては、具体的な手法を開示した発明は未だなされていない。特に、ニトリルヒドラーターゼの立体構造に注目し、その構造を変化させる事によって上記の性質を改変する方法に関しては、その試み自体がなされていない。

尚、ニトリルヒドラーターゼをコードする遺伝子を宿主細胞で発現させて酵素活性のあるニトリルヒドラーターゼを生産する場合に該酵素の活性化に関与するタンパク質が存在する点が特許文献5に開示されている。

特許文献1：特開平2-470号公報

特許文献2：特開平4-211379号公報

特許文献3：特開平8-56684号公報

特許文献4：特開平9-275978号公報

特許文献5：特開平11-253168号公報

非特許文献1：Kobayashi M, Nishiyama M, Nagasawa T, Horinouchi S, Beppu T, Yamada H. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of two cobalt-containing nitrile hydratase genes from *Rhodococcus*

rhodochrous J1. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Dec 2;1129(1):23-33.

非特許文献2 : Huang W, Jia J, Cummings J, Nelson M, Schneider G, Lindqvist Y. Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold. *Structure*. 1997 May 15;5(5):691-9.

非特許文献3 : Nagashima S, Nakasako M, Dohmae N, Tsujimura M, Takio K, Odaka M, Yohda M, Kamiya N, Endo I. Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms. *Nat Struct Biol*. 1998 May;5(5):347-51.

非特許文献4 : Miyanaga, A., Fushinobu, S., Ito, K., and Wakagi, T. Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase. *Biochem Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Nov 16;288(5):1169-74.

#### 発明の開示

本発明の目的は、機能を実質的に変化させない新規な置換変異部位を有するニトリルヒドラーゼのアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列を提供する事である。さらに、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株、該細胞株を用いた該酵素の産生方法、及び該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法をも提供する事である。

また本発明の他の目的は、ニトリルヒドラーゼ本来の活性は損なう事無く、活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性等の性質のうちの一つ以上を変化させる事を含む方法に関する具体的手法を提供する事である。具体的には、ニトリルヒドラーゼの立体構造に変化を及ぼす変異をニトリルヒドラーゼ遺伝子に導入する事によって上記の性質を改変する方法を提供する事である。更に、改変方法によって得られたニトリルヒドラーゼ、該ニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含むプラスミド、該遺伝子乃至該プラスミドにより形質転換された細胞株、該細胞株を用いた該ニトリルヒドラーゼの産生方法、及び該細胞株を培養して得られる培

養液・細胞・細胞処理物を用いてニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する方法をも提供する事である。

本発明者らはかかる状況の下、特開平 9-275978 号公報（特許文献 4）に開示されているニトリルヒドラターゼ遺伝子に、該公報には開示されていない新規な置換変異部位を導入し、該変異導入後の該遺伝子の塩基配列を決定した。さらに、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドにより形質転換された細胞株を作製した。また、該細胞株を用いた該酵素の産生や該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いたニトリル化合物からの対応アミド化合物の製造に関しても鋭意検討を重ねた結果、本願発明を完成させるに至った。

本発明にかかるニトリルヒドラターゼの  $\alpha$  サブユニットは、配列番号：1 に示される  $\alpha$  サブユニットのアミノ酸配列の 36 番目、71 番目、148 番目、及び 204 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列を有することを特徴とする。

本発明にかかるニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットは、配列表の配列番号：2 に示す  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列の 10 番目、32 番目、37 番目、41 番目、46 番目、48 番目、51 番目、72 番目、118 番目、127 番目、146 番目、160 番目、186 番目及び 217 番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列を有することを特徴とする。

本発明にかかるニトリルヒドラターゼは、 $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットを有し、これらのサブユニットの少なくとも一方が上記の変異を有することを特徴とする。

本発明にかかるニトリルヒドラターゼの  $\alpha$  サブユニットをコードする遺伝子は、上記の  $\alpha$  サブユニットにおける変異を有するアミノ酸配列をコードすることを特徴とする。本発明にかかるニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子は、上記の  $\beta$  サブユニットにおける変異を有するアミノ酸配列をコードすることを特徴とする。

本発明にかかるニトリルヒドラターゼをコードする遺伝子は、 $\alpha$  サブユニットをコードする遺伝子と  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子とを有し、これらのサ

プユニットの少なくとも一方が上記の変異を有することを特徴とする。

本発明のプラスミドは、上記の遺伝子のいずれかを有することを特徴とする。

本発明の形質転換体は、上記のプラスミドを用いて宿主細胞を形質転換することに得られたものであることを特徴とする。

本発明のニトリルヒドラターゼの製造は、上記の形質転換体、該形質転換体の培養液、または該形質転換体や該培養液の処理物からニトリルヒドラターゼを回収する工程を有することを特徴とする。

本発明のアミド化合物の製造方法は、水性媒体中でニトリル化合物を上記のニトリルヒドラターゼとを接触させて該ニトリル化合物を対応するアミド化合物に変換する工程を有することを特徴とする。

そして更に本発明者らはかかる状況の下、特許文献2、特許文献4に開示されているニトリルヒドラターゼ遺伝子を例として、新規な観点に基づいて変異の対象となる領域を特定し、該領域を形成するアミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸に、置換、挿入又は削除等の変更を加える事によってニトリルヒドラターゼの改変方法を実施した。具体的には、非特許文献2、3、4及びPDB番号1AHJ・2AHJ・1IREとして公開されているニトリルヒドラターゼの立体構造を参照し、鋭意解析を実施する事によって、目的に適う変更対象領域を特定した。より具体的には、立体構造の解析により、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域、及び2量体形成に関与する $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニット間の会合界面や2量体同士の会合に関与する界面を形成する領域を特定した。アミノ酸配列に置換、挿入又は削除等の変更を加える方法としては、特に限定されないが、遺伝子組換えの技法を用いた変異導入法を、その例として挙げる事が出来る。

更に、該変更後の該遺伝子の塩基配列を決定し、該遺伝子を含むプラスミド、該遺伝子乃至該プラスミドにより形質転換された細胞株を作製し、該細胞株を用いた該酵素の産生や該細胞株を培養して得られる培養液・細胞・細胞処理物を用いたニトリル化合物からの対応アミド化合物の製造を実施する事によって改変方法がニトリルヒドラターゼの性質にいかなる変化を及ぼしているかを観察した。改変対象となるニトリルヒドラターゼを構成するアミノ酸配列の様々な位置への

変更及びそれによって得られた様々な改変酵素に関して鋭意検討を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、上述した特徴に加え下記〔１〕から〔２２〕に示す通りである。

〔１〕 ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の１箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか１つ以上の性質を変化させる改変方法、

（ａ）改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列及び配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

（ｂ）アラインメント結果から、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列中の 36 番目スレオニンより 48 番目アスパラギンに至る領域、配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列中の 31 番目リジンより 51 番目フェニルアラニンに至る領域、及び 112 番目リジンより 127 番目ロイシンに至る領域に相当するアミノ酸残基を特定する、

（ｃ）特定されたアミノ酸残基の内の１箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

〔２〕 ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の１箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか１つ以上の性質を変化させる改変方法、

（ｄ）改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列及び配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

（ｅ）アラインメント結果から、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列中の 36・48・71・148・188・204 番目に相当するアミノ酸残基、配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列中の 10・32・33・37・40・41

・ 46・48・51・61・72・112・118・127・146・150・  
160・168・171・176・186・217・218番目に相当するアミノ酸残基を特定する、

(f) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

[3] ニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(g) 改変前のニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB (Protein Data Bank) 番号1IRE記載のニトリルヒドラーゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づ

いたアラインメントを行う事により推定する、

(h) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラーゼ立体構造中のA鎖 (Chain 1IRE:A) におけるN末から数えて2番目のヘリックス、及びB鎖 (Chain 1IRE:B) におけるN末から数えて1番目のヘリックス、2番目のヘリックス、及びそれらには含まれたループ部分とC末から数えて3番目のヘリックスに相当する領域のアミノ酸残基を特定する、

(i) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

[4] ニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(j) 改変前のニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラーゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(k) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラーゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸残基であるグルタ

ミン、165番目のアミノ酸残基であるグルタミン酸に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸残基であるフェニルアラニン、48番目のアミノ酸であるロイシンに相当する4つのアミノ酸残基を特定する、

(1) 特定された4つのアミノ酸残基の側鎖先端重原子を各々中心点とした立体構造上半径5 Å内の範囲に側鎖先端重原子が含まれるアミノ酸残基を特定する、

(m) 上記1で特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

[5] ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(n) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(o) 推定された立体構造に基づき、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域を特定する、

(p) 特定された領域を構成するアミノ酸残基の内、それを変更する事が空洞の大きさを変化させ、延いては基質/生成物の通過し易さ/し難さを制御するアミノ酸残基を特定する、

(q) 上記pで特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、

[6] ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(r) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番

号1 I R E記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(s) 推定された立体構造に基づき、P D B番号1 I R E記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸であるグルタミン(A 8 9 Q)、165番目のアミノ酸であるグルタミン酸(A 1 6 5 E)に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸であるフェニルアラニン(B 3 7 F)、48番目のアミノ酸であるロイシン(B 4 8 L)に相当するアミノ酸残基の4つのアミノ酸残基を特定する、

(t) A 1 6 5 Eに相当するアミノ酸残基とB 4 8 Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd 1、A 8 9 Qに相当するアミノ酸残基とB 4 8 Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd 2、B 3 7 Fに相当するアミノ酸残基とB 4 8 Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd 3と規定し、d 1から3の1つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する、

(u) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う、  
〔7〕 (t)の工程が以下の(t')のとおりである〔6〕に記載の改変方法、

(t') A 1 6 5 Eに相当するアミノ酸残基とB 4 8 Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd 1、A 8 9 Qに相当するアミノ酸残基とB 4 8 Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd 2、B 3 7 Fに相当するアミノ酸残基とB 4 8 Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd 3、A 1 6 5 Eに相当するアミノ酸残基とB 3 7 Fに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd 4、A 8 9 Qに相当するアミノ酸残基とB 3 7 Fに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd 5と規定し、d 1から5の1つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する、

〔8〕 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素が下記の〔A〕と〔B〕の2種類のポリペプチドを含む事を特徴とする〔1〕から〔7〕の何れか一項記載の改変方法、

〔A〕配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列と40%以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチド、

〔B〕配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列と 25% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチド、

〔9〕 〔A〕のポリペプチドが下記〔C〕のポリペプチドであり、〔B〕のポリペプチドが下記〔D〕ポリペプチドである事を特徴とする〔8〕記載の改変方法、

〔C〕配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 箇所に関して置換、挿入又は削除を行ったアミノ酸配列、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列の 6・19・38・77・90・102・106・126・130・142・146・187・194・203 番目のアミノ酸の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列、の何れかのアミノ酸配列から成るポリペプチド、

〔D〕配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列、配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 箇所に関して置換、挿入又は削除を行ったアミノ酸配列、配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列の 20・21・108・200・212 番目のアミノ酸の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列、の何れかのアミノ酸配列から成るポリペプチド、

〔10〕 〔A〕のポリペプチドが下記〔E〕のポリペプチドであり、〔B〕のポリペプチドが下記〔F〕のポリペプチドである事を特徴とする〔8〕記載の改変方法、

〔E〕配列表の配列番号 104 記載の塩基配列の 704 番目から 1315 番目によって成る ORF（オープンリーディングフレーム）がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド、

〔F〕配列表の配列番号 104 記載の塩基配列の 1 番目から 680 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド、

〔11〕 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素が構成要素として含む 2 種のポリペプチドの内、1 つが〔10〕記載の〔E〕のポリペプチドであり、もう 1 つのポリペプチドが〔10〕記載の〔F〕のポリペプチドである事を特徴とし、且つ以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミ

ノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行うことにより、該酵素の活性、基質特異性、 $V_{max}$ 、 $K_m$ 、熱安定性、基質に対する安定性、生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(d') 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

(e') アラインメント結果から、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列中の48・51番目に相当するアミノ酸残基を特定する、

(f') 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う

〔12〕 [A] のポリペプチドが下記 [G] のポリペプチドである事を特徴とする〔8〕記載の改変方法、

[G] アミノ酸配列  $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$  で表される領域を含むポリペプチド

(ここにおいて、Cはシステインを、Xはセリン又はスレオニンを、Lはロイシンを、 $C_1$ はシステインスルフィニ酸 (CYSTEINE SULFINIC ACID・3-SULFINOALANINE) を、Sはセリンを、 $C_2$ はシステインスルフェニ酸 (CYSTEINE SULFENIC ACID・S-HYDROXY-CYSTEINE) を、 $X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot X_4 \cdot X_5$  は任意のアミノ酸を示す。)、

〔13〕  $X_1$  がバリン、 $X_4$  がトリプトファン、 $X_5$  がプロリンである事を特徴とする〔12〕記載の改変方法、

〔14〕  $X_2$  がチロシン、 $X_3$  がプロリンである事を特徴とする〔13〕記載の改変方法、

〔15〕  $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$  で表される領域を介して金属原子と結合している事を特徴とする〔12〕から〔14〕の何れか一項記載の改変方法、

〔16〕 金属原子がコバルト原子である事を特徴とする〔15〕記載の改変方法、

〔17〕 〔1〕から〔16〕の何れか一項記載の改変方法により得られる事を特徴とする改変酵素、

- [18] [17] 記載の改変酵素をコードする遺伝子、  
[19] [18] 記載の遺伝子を含む事の特徴とするプラスミド、  
[20] 微生物を [18] 記載の遺伝子又は [19] 記載のプラスミドを用いる形質転換をすることにより得られる事の特徴とする形質転換体、  
[21] [20] 記載の形質転換体を培養して得られる培養液、細胞、又はそれらの処理物から改変酵素を回収する工程を含む事の特徴とする改変酵素の調製方法、  
[22] [20] 記載の形質転換体を培養して得られる培養液、細胞、又はそれらの処理物、又は [21] 記載の調製方法により得られる改変酵素をニトリル化合物と溶媒中で接触させる事により該ニトリル化合物を対応するアミド化合物へと転化させる工程を含む事の特徴とするアミド化合物製造方法、

本発明により、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの本質的な機能を変化させる事の無い新規な変異点を有するニトリルヒドラーゼのアミノ酸配列及び該遺伝子の塩基配列が提供される。さらに、該遺伝子を含むプラスミド、該プラスミドを含む形質転換体、該形質転換体を用いた該酵素の産生方法、及び該形質転換体を用いたニトリル化合物からの対応するアミド化合物の製造方法が提供される。

また本発明により、ニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素の立体構造を変化させる事の特徴とする手法を用いて、改変前のニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素を改変する方法が提供される。この方法を用いる改変方法としては、活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性等といった性質のうちの一つ以上が改変される事の特徴とする効果が得られる事がその効果として挙げられる。また本発明により、新規な変異点を有するニトリルヒドラーゼ、該酵素を構成するポリペプチド鎖をコードする遺伝子が提供される。更に、該遺伝子を含むプラスミド、該遺伝子乃至該プラスミドを含む形質転換体、該形質転換体を用いた該酵素の産生方法、及び該形質転換体を用いたニトリル化合物からの対応するアミド化合物の製造方法が提供される。

#### 図面の簡単な説明

図1はMT10822より抽出したプラスミドpPT-DB1の制限酵素切断点地図である。(参考例1、実施例1、83)

図2はロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラーゼを活性発現させる為に構築したプラスミドpJ1H-DB1の制限酵素切断点地図である。(実施例84)

図1及び図2中で使用される略号は以下の意味を表す。

bla:  $\beta$ -ラクタマーゼをコードするORFを示す。

ColE1-ori: ColE1系の複製開始部位を示す。

lacZ: pUC18由来のラクトースオペロンのプロモーターおよびオペレーター領域を示す。

NH $\alpha$ : シュードノカルディア サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの $\alpha$ サブユニットをコードするORFを示す。

NH $\beta$ : シュードノカルディア サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットをコードするORFを示す。

P16: シュードノカルディア サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼの活性化に關与する事を特徴とする蛋白質をコードするORFを示す。

nhaA: ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラーゼの $\alpha$ サブユニットをコードするORFを示す。

nhaB: ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットをコードするORFを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について更に詳細に説明する。

本発明のニトリルヒドラーゼは、ニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素に変異を導入して得られるものであり、たとえばシュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼに変異を導入して得られたものである。そのようなものは具体的には、配列表の配列番号: 1 及び 2 に示すアミノ酸配列の所

定の部位の少なくとも1つ以上におけるアミノ酸を他のアミノ酸で置換したものにより基本的に構成される。すなわち、本発明は、配列表の配列番号：1に示される205個のアミノ酸の配列により表される $\alpha$ サブユニットの内の少なくとも1個以上を他のアミノ酸で置換したものを構成要素とするニトリルヒドラーゼ、配列表の配列番号：2に示される233個のアミノ酸の配列により表される $\beta$ サブユニットの構成アミノ酸計438個の内の少なくとも1個以上を他のアミノ酸で置換したものを構成要素とするニトリルヒドラーゼ及びその両方を構成要素とするニトリルヒドラーゼを含んでいる。

本発明における、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼに変異を導入して得られたニトリルヒドラーゼに用いられる具体的なアミノ酸配列には、以下のものが含まれる。

(a-0) 配列表の配列番号：1の $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列

(a-1) 配列表の配列番号：1に示される $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の36番目、71番目、148番目、及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列

(a-2) 配列表の配列番号：1に示される $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目、及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列

(b-0) 配列表の配列番号：2に示される $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列

(b-1) 配列表の配列番号：2に示す $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列

(b-2) 配列表の配列番号：2に示す $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目、及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異を有するアミノ酸配列

上記の各変異は、変異前のニトリルヒドラターゼ活性を少なくとも維持し得るものである。

本発明における、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼに変異を導入して得られたニトリルヒドラターゼは、上記の (a-0) ~ (b-2) から選択されたアミノ酸配列を有する以下の構成要素からなる。

(A-1)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(A-2)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-1) 及び (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(B-1)  $\beta$ サブユニットが上記の (b-1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(B-2)  $\beta$ サブユニットが上記の (b-1) 及び (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(A-3)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-0) のアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(A-4)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(A-5)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(A-6)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-1) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-1) 及び (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(A-7)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-1) 及び (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-0) のアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(A-8)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-1) 及び (a-2) の変異を含むア

ミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-1) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(A-9)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-1) 及び (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(A-10)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-1) 及び (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-1) 及び (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(B-3)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-0) のアミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-1) のアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(B-4)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-0) のアミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-1) 及び (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

(B-5)  $\alpha$ サブユニットが上記の (a-2) の変異を含むアミノ酸配列を有し、 $\beta$ サブユニットが上記の (b-1) 及び (b-2) の変異を含むアミノ酸配列を有するニトリルヒドラターゼ

なお、上記の特定された変異部位以外のアミノ酸については、上記の特定部位の変異による目的とするニトリルヒドラターゼ活性を損なわない範囲内で、アミノ酸の置換、挿入、欠失が生じてよい。

本発明において、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼに変異を導入して得られたニトリルヒドラターゼ遺伝子には、ニトリルヒドラターゼの  $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子及びニトリルヒドラターゼの  $\beta$ サブユニットをコードする遺伝子が含まれる。

本発明にかかる遺伝子の一群としては、シュードノカルディア・サーモフィラ由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子に変異導入を施したものが挙げられ、これには、 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子； $\beta$ サブユニットをコードする遺伝子；及び  $\alpha$ サブユニットをコードする遺伝子と  $\beta$ サブユニットをコードする遺伝子の両方を有するニトリルヒドラターゼ遺伝子が含まれる。

具体的には、以下のものを挙げることができる。

(G-1) 先に挙げた (a-1) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子；

(G-2) 先に挙げた (a-1) 及び (a-2) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子；

(G-3) 先に挙げた (b-1) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子；

(G-4) 先に挙げた (b-1) 及び (b-2) の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子；及び

(G-5) 先に挙げた (A-1) ~ (B-4) のいずれかのニトリルヒドラーゼをコードする塩基配列を有する遺伝子。

上記の変異の基礎となる配列番号：1の $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする塩基配列としては、配列番号：3の塩基配列が好ましい。また、上記変異の基礎となる配列番号：2の $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする塩基配列としては、配列番号：4の塩基配列が好ましい。

例えば、配列番号：3を基礎とした場合の上記 (a-1) の変異は、配列番号：3の塩基配列の106番目から108番目、211番目から213番目、442番目から444番目、及び610番目から612番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得ることができる。

また、配列番号：3を基礎とした場合の上記 (a-2) の変異は、配列番号：3の塩基配列の16番目から18番目、55番目から57番目、112番目から114番目、229番目から231番目、268番目から270番目、304番目から306番目、316番目から318番目、376番目から378番目、388番目から390番目、424番目から426番目、436番目から438番目、559番目から561番目、580番目から582番目、及び607番目から609番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換した塩基配列の一部を置換して得ることができる。

一方、配列番号：4を基礎とした場合の上記 (b-1) の変異は、配列番号：4の塩基配列の28番目から30番目、94番目から96番目、109番目から111番目、121番目から123番目、136番目から138番目、142番

目から144番目、151番目から153番目、214番目から216番目、352番目から354番目、379番目から381番目、436番目から438番目、478番目から480番目、556番目から558番目、及び649番目から651番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得ることができる。

また、配列番号：4を基礎とした場合の上記（b-2）の変異は、配列番号：4の塩基配列の58番目から60番目、61番目から63番目、322番目から324番目、598番目から600番目、及び634番目から636番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換した塩基配列の一部を置換して得ることができる。

これらの置換は、各遺伝子がコードする $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットの少なくとも一方が組み込まれたニトリルヒドラターゼの活性が置換前の状態を維持、またはそれよりも向上するような範囲内で行われる。なお、変異導入手段に関しては特に限定されない。

本発明のニトリルヒドラターゼ遺伝子における上記の（a-1）、（a-2）、（b-1）及び（b-2）の変異部位以外の部位については、それがニトリルヒドラターゼ活性を有するタンパク質の鑄型として機能できる範囲内で、塩基の置換、挿入または削除による更なる変異を有するものでもよい。

このような更なる変異については以下のような例をあげることができる。ある一定の塩基配列を有する遺伝子を鑄型として転写・翻訳された場合であっても、それを導入する宿主細胞の種類や培養に使用する栄養培地の成分や組成若しくは培養時の温度やpH等によっては、遺伝子発現後の宿主細胞内酵素による修飾などにより、所期の酵素作用は保持しているものの配列表におけるN末端付近のアミノ酸の1個又は2個以上が欠失したり、N末端に1個又は2個以上のアミノ酸が新たに付加した異型体を産生する事があり得る。その為、そのような異型なニトリルヒドラターゼも本発明に含まれるものとする。

一方、本発明のニトリルヒドラターゼ生産用のプラスミドは上記のニトリルヒドラターゼ遺伝子を用いて調製することができる。具体例としては以下のものを挙げるこのができる。

(P-1) 先に挙げた(a-1)の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；

(P-2) 先に挙げた(a-1)及び(a-2)の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；

(P-3) 先に挙げた(b-1)の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；

(P-4) 先に挙げた(b-1)及び(b-2)の変異を有するアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するプラスミド；及び

(P-3) 先に挙げた(A-1)～(B-4)のいずれかのニトリルヒドラーゼをコードする塩基配列を有するプラスミド。

また、本発明にかかる形質転換体または細胞株は、このプラスミドを用いて任意の宿主細胞を形質転換して得られたものである。本発明のニトリルヒドラーゼの生産方法は、上記の形質転換体や細胞株を培養してニトリルヒドラーゼを産生させる工程を有する。また、本発明のアミド化合物の製造方法は、このようなニトリルヒドラーゼを産生する形質転換体や細胞株を培養して得られる培養液、細胞または細胞処理物を媒体中にてニトリル化合物と接触させて対応するアミド化合物を製造させる工程を有する。

以下、本発明のニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素の改変方法について詳細に説明する。

本発明において、ニトリルヒドラーゼ活性とは、ニトリル化合物を対応するアミド化合物に水和する活性を言う。該活性を有する酵素とは、一般的には $\alpha$ サブユニット、 $\beta$ サブユニットと称される2種のポリペプチド鎖を構成要素とする事の特徴とし、ニトリルヒドラーゼ遺伝子とは、これら2種のポリペプチド鎖を形成する事の特徴とする2つのアミノ酸配列乃至それらをコードする事の特徴とする2つのORF（オープンリーディングフレーム）を成す塩基配列を指す。

シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼ（配列表の配列番号98及び99、特許文献3、非特許文献4、PDB番号：1IRE参照）を例にして具体的に述べると、配列表の配列番号98記載のア

ミノ酸配列から成るポリペプチド及びPDB番号1IRE記載のニトリルヒドラーゼ立体構造中のA鎖が $\alpha$ サブユニット、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド及びPDB番号1IRE記載のニトリルヒドラーゼ立体構造中のB鎖が $\beta$ サブユニットである。また、配列表の配列番号100記載の塩基配列から成るORFと配列表の配列番号101記載の塩基配列から成るORFとをニトリルヒドラーゼ遺伝子と言う。

また、ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラーゼ（配列表の配列番号104、特許文献2、非特許文献1参照）の場合、配列表の配列番号104記載の塩基配列の704番目から1315番目によって成るORFがコードするアミノ酸配列から成るポリペプチドが $\alpha$ サブユニット、配列表の配列番号104記載の塩基配列の1番目から690番目によって成るORFがコードするアミノ酸配列から成るポリペプチドが $\beta$ サブユニットである。また、配列表の配列番号104記載の塩基配列がコードする2つのORFをニトリルヒドラーゼ遺伝子と言う。

本発明における改変方法とは、ニトリルヒドラーゼ本来の活性は損なう事無く、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる目的の下、改変前のニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素の立体構造を変化させる事を志向する手法であり、その特徴として、立体構造の解析により、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域、及び／又は、2量体形成に関与する $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニット間の会合界面や2量体同士の会合に関与する界面を形成する領域を特定し、該領域に存在するアミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸の何れか1箇所以上に、置換、挿入又は削除等の変更を加える工程を含む事が挙げられる。

シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼ（配列表の配列番号98及び99・特許文献3・非特許文献4・PDB番号：1IRE参照）を例にして具体的に述べると、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域に存在するアミノ酸残基に相当するのは、PDB番号1IRE記載のニトリ

ルヒドラーターゼ立体構造中のB鎖におけるN末から数えて1番目のヘリックス・2番目のヘリックス・それらには含まれたループ部分に相当する領域を形成するアミノ酸残基、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラーターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸残基であるグルタミン・165番目のアミノ酸残基であるグルタミン酸に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸残基であるフェニルアラニン・48番目のアミノ酸であるロイシンに相当する4つのアミノ酸残基の側鎖先端重原子を各々中心点とした立体構造上半径5 Å内の領域に側鎖先端重原子が含まれるアミノ酸残基、配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列中の36番目スレオニンより48番目アスパラギンに至る領域、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列中の31番目リジンより51番目フェニルアラニンに至る領域、及び112番目リジンより127番目ロイシンに至る領域に相当するアミノ酸残基、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列中の37・40・41・46・48・51・61・72・112・118・127番目に相当するアミノ酸残基等が挙げられる。

また、2量体形成に関与する $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニット間の会合界面や2量体同士の会合に関与する界面を形成する領域に存在するアミノ酸残基に相当するのは、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラーターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から数えて2番目のヘリックス、B鎖におけるN末から数えて2番目のヘリックス、配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列中の36番目スレオニンより48番目アスパラギンに至る領域、配列表の配列番号99記載の112番目リジンより127番目ロイシンに至る領域に相当するアミノ酸残基、配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列中の36・71・148・188・204番目に相当するアミノ酸残基、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列中の10・32・33・112・118・127・146・150・160・168・171・176・186・217・218番目に相当するアミノ酸残基等が挙げられる。

更に、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域を構成するアミノ酸残基の内、それを変更する事が空洞の大きさを変化させ、延いては基質／生成物の通過し易さ／

し難さを制御するアミノ酸残基を特定する方法としては、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸であるグルタミン(A89Q)、165番目のアミノ酸であるグルタミン酸(A165E)に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸であるフェニルアラニン(B37F)、48番目のアミノ酸であるロイシン(B48L)に相当する4つのアミノ酸残基を特定し、A165EとB48Lとの最短重原子間距離をd1、A89QとB48Lとの最短重原子間距離をd2、B37FとB48Lとの最短重原子間距離をd3、A165EとB37Fとの最短重原子間距離をd4、A89QとB37Fとの最短重原子間距離をd5と規定し、d1から5の1つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する、該d1から3の1つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する等が挙げられる。

従って、対象となるニトリルヒドラターゼ(シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のものをその代表例として挙げる事が出来る。)に対して、上記の様にして特定した何れか1つ以上のアミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸に、置換、挿入又は削除等の変更を加える工程から成る改変方法は、本発明に含まれる。

また、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095以外の生物種由来のニトリルヒドラターゼ(例えばロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼ)をシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼの立体構造やアミノ酸配列とアラインメントし、上記のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を見出し、相当するアミノ酸配列中のアミノ酸を変更する事による改変方法も本発明に含まれる。

以上に列挙した内容を実施するに当って、立体構造乃至アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行うに際して、それに用いる手段は特に限定されないが、アミノ酸配列のアラインメントの手段としては日立ソフト社製のDNASISやフリーソフトのCLUSTALWやBLAST等の遺伝子配列解析ソフトが、アミノ酸配列のアラインメントに基づく立体構造のモデリングの手段としてはアクセリス社製のモデラーやホモロジー等の蛋白質立体構造予測ソフトが、各々例として挙げられる。

一例を述べると、ロドコッカス ロドクロウス J-1 株由来のニトリルヒドラターゼ（配列表の配列番号 104・特許文献 2・非特許文献 1 参照）の場合、アラインメントの結果、配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列中の 48 番目に相当するアミノ酸残基：L e u に相当するアミノ酸残基は、配列表の配列番号 104 記載の塩基配列の 1 番目から 690 番目によって成る O R F がコードするアミノ酸配列の 48 番目に相当するアミノ酸残基：T r p であり、配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列中の 51 番目に相当するアミノ酸残基：P h e に相当するアミノ酸残基は、配列表の配列番号 104 記載の塩基配列の 1 番目から 690 番目によって成る O R F がコードするアミノ酸配列の 51 番目に相当するアミノ酸残基：S e r である。これは、アミノ酸配列に基づいたアラインメントと立体構造に基づいたアラインメントとで一致する結果である。この 2 つのアミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸の何れか一方又は両方を変更する事による改変方法も本発明に含まれる。

尚、以上の改変方法を実施するに当って、アミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸を変更する為の変異導入手段に関しては、特に限定されないが、遺伝子組換えの技法を用いてアミノ酸配列中のアミノ酸を他のアミノ酸に置換する変異導入法を、その例として挙げる事が出来る。

また、意図して導入した変異以外に副次的に導入される変異によるアミノ酸配列や塩基配列の変化については、意図した変異導入による目的のニトリルヒドラターゼ活性を損なわない範囲内で、アミノ酸や塩基の置換、挿入又は削除が生じてよい。

この様な副次的に導入される変異については以下の様な例を挙げる事が出来る。ある一定の塩基配列を有する遺伝子を鋳型として転写・翻訳された場合であっても、それを導入する宿主細胞の種類や培養に使用する栄養培地の成分や組成又は培養時の温度や pH 等によっては、遺伝子発現後の宿主細胞内酵素による修飾などにより、初期の酵素作用は保持しているものの配列表における N 末端付近のアミノ酸の 1 個又は 2 個以上が欠失したり、N 末端に 1 個又は 2 個以上のアミノ酸が新たに付加した異型体を産生する事があり得る。その為、そのような異型なニトリルヒドラターゼをもたらす改変方法も本発明に含まれる。

本発明における改変方法の対象となる、改変前のニトリルヒドラーゼの例としては、ロドコッカス ロドクロウス J-1 株由来のニトリルヒドラーゼとシェードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラーゼとを挙げる事が出来る。具体的には、配列表の配列番号 104 記載の塩基配列の 1 番目から 690 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列によって形成されるポリペプチド鎖と配列表の配列番号 104 記載の塩基配列の 704 番目から 1315 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列によって形成されるポリペプチド鎖とを構成要素とするニトリルヒドラーゼと、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列によって形成されるポリペプチド鎖と配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列によって形成されるポリペプチド鎖とを構成要素とするニトリルヒドラーゼと、を挙げる事が出来る。

本発明における改変方法の対象となる、改変前のニトリルヒドラーゼには、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列と 40% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチドと配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列と 25% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチドとを構成要素とするニトリルヒドラーゼも含まれる。

配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列と 40% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチドの例としては、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 箇所に関して置換、挿入又は削除の何れかの変更を施したアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列の 6・19・38・77・90・102・106・126・130・142・146・187・194・203 番目のアミノ酸の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 104 記載の塩基配列の 704 番目から 1315 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド等を挙げる事が出来る。

また、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列と 40% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチドは、その配列中に  $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3$

$X_4X_5$  (ここにおいて、Cはシステインを、Xはセリン又はスレオニンを、Lはロイシンを、 $C_1$ はシステインスルフィン酸 (CYSTEINE SULFINIC ACID・3-SULFINOALANINE) を、Sはセリンを、 $C_2$ はシステインスルフェン酸 (CYSTEINE SULFENIC ACID・S-HYDROXY-CYSTEINE) を、 $X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot X_4 \cdot X_5$ は任意のアミノ酸を示す。) で表される領域を含むポリペプチドである事の特徴とする場合がある。加えて、 $X_1$ がバリン、 $X_4$ がトリプトファン、 $X_5$ がプロリンであるポリペプチドである事の特徴とする場合がある。更に加えて、 $X_2$ がチロシン、 $X_3$ がプロリンであるポリペプチドである事の特徴とする場合がある。

上記の場合、 $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$ で表される領域を介して金属原子と結合している事の特徴とする場合がある。加えて、該金属がコバルトである事の特徴とする場合がある。

配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列と 25% 以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチドの例としては、配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 箇所に関して置換、挿入又は削除の何れかの変更を施したアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列の 20・21・108・200・212 番目のアミノ酸の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列から成るポリペプチド、配列表の配列番号 104 記載の塩基配列の 1 番目から 690 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド等を挙げる事が出来る。

一例を述べると、ロドコッカス ロドクロウス J-1 株由来のニトリルヒドラーターゼの場合、配列表の配列表の配列番号 104 記載の塩基配列の 704 番目から 1315 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列から成るポリペプチドと配列表の配列番号 104 記載の塩基配列の 1 番目から 690 番目によって成る ORF がコードするアミノ酸配列から成るポリペプチドとを構成要素とするニトリルヒドラーターゼであるので、本発明における改変方法の対象となる、改変前のニトリルヒドラーターゼに含まれる。

また、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラーターゼは、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列から成るポリペプチド

と配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列から成るポリペプチドとを構成要素とするニトリルヒドラターゼであるので、本発明における改変方法の対象となる、改変前のニトリルヒドラターゼに含まれる。

更に、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラターゼから派生したニトリルヒドラターゼの例として、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラターゼの構成要素の内、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列から成るポリペプチドが、配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 箇所に関して置換、挿入又は削除の何れかの変更を施したアミノ酸配列から成るポリペプチド、或いは配列表の配列番号 98 記載のアミノ酸配列の 6・19・38・77・90・102・106・126・130・142・146・187・194・203 番目のアミノ酸の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列から成るポリペプチドに置き換わったニトリルヒドラターゼである事、及び配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列から成るポリペプチドが、配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列の少なくとも 1 箇所に関して置換、挿入又は削除の何れかの変更を施したアミノ酸配列から成るポリペプチド、或いは配列表の配列番号 99 記載のアミノ酸配列の 20・21・108・200・212 番目のアミノ酸の少なくとも 1 つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列から成るポリペプチドに置き換わったニトリルヒドラターゼである事の、何れか一方又は両方の条件を満たすニトリルヒドラターゼを挙げる事が出来る。

シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラターゼから派生したニトリルヒドラターゼも、本発明における改変方法の対象となる、改変前のニトリルヒドラターゼに含まれる。

本発明において、改変酵素とは、ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素を対象として改変方法を実施する事によって得られるニトリルヒドラターゼを言う。その例としては、上述の改変方法を用いて改変前のニトリルヒドラターゼの形質を変化させて得られる事を特徴とする改変酵素を、その例として挙げる事が出来る。

形質の変化としては、改変前のニトリルヒドラターゼと比較した場合、基質特

異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質（：該酵素が触媒として機能し、対応するアミド化合物に変換する事が可能な任意のニトリル化合物が例として挙げられる。）に対する安定性・生成物（：該酵素が触媒として機能し、任意のニトリル化合物を変換する事で得られる対応するアミド化合物が例として挙げられる。）に対する安定性等といった性質の何れか1つ以上の性質に関する変化を挙げる事が出来る。具体的な例としては、

- 1) 相対的に、より嵩高いニトリル化合物を基質とし易くなる。
  - 2) 相対的に、より嵩の小さいニトリル化合物を基質とし易くなる。
  - 3) 任意のニトリル化合物を基質とする場合の $V_{max}$ が向上する。
  - 4) 任意のニトリル化合物を基質とする場合の $K_m$ が低減する。
  - 5) 酵素を任意の熱量に暴露した場合の不可逆的失活率が軽減する。
  - 6) 酵素を任意濃度の基質に暴露した場合の不可逆的失活率が軽減する。
  - 7) 反応中に任意濃度の生成物が存在する事による反応阻害率が軽減する。
  - 8) 酵素を任意濃度の生成物に暴露した場合の不可逆的失活率が軽減する。
- 等を挙げる事が出来る。

本発明における改変前のニトリルヒドラーゼを対象とした改変方法がもたらす形質変化の指標としては、基質特異性の変化をその代表例の1つに挙げる事が出来る。本発明における改変方法によって得られる改変酵素が、基質特異性の変化したものである場合、その改変酵素は、本発明における改変酵素に含まれる。

得られる改変酵素の基質特異性の変化を観察する方法としては、嵩高さの異なる複数種のニトリル化合物を基質とする反応を行い、生成する対応アミド化合物量の違いを測定する方法が挙げられる。その一例としては、アクリロニトリルを基質とする反応で生成するアクリルアミドとメタクリルニトリルを基質とする反応で生成するメタクリルアミドとのモル比を比較する方法がある。この場合、改変前の対象と比較して〔生成するメタクリルアミドのモル量〕÷〔生成するアクリルアミドのモル量〕の値が大きくなる方向に変化した改変酵素は、より嵩高いニトリル化合物を基質とし易くなる形質の変化を示したと言え、その値が小さくなる方向に変化した改変酵素は、より嵩の小さいニトリル化合物を基質とし易くなる形質の変化を示したと言える。

シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼ、及びシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼから派生したニトリルヒドラーゼを対象とした例においては、立体構造の解析により、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域、及び／又は、2量体形成に関与する $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニット間の会合界面や2量体同士の会合に関与する界面を形成する領域を特定し、該領域に存在するアミノ酸残基に相当するアミノ酸配列中のアミノ酸の何れか1箇所以上に、置換、挿入又は削除等の変更を加える工程を含む改変方法を実施した場合、改変前の対象と比較して、アクリロニトリルを基質とする反応で生成するアクリルアミドとメタクリルニトリルを基質とする反応で生成するメタクリルアミドとのモル比が変化した改変酵素が得られた。この事は基質特異性すなわち形質の変化したものであると言えるので、得られた改変酵素は、本発明における改変酵素に含まれる。

ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラーゼを対象とした例においては、配列表の配列番号104記載の塩基配列の1番目から690番目によって成るORFがコードするアミノ酸配列の48番目に相当するアミノ酸残基：Trpを他のアミノ酸残基に変更する事による改変方法を実施した場合、改変前の対象と比較して、より嵩高いニトリル化合物を基質とし易くなる形質の変化を示した。従って、獲得した形質変化を示す蛋白質は、本発明における改変酵素に含まれる。

尚、得られる改変酵素が有する変異部位を組み合わせる事によって、更なる形質の変化がもたらされる事は容易に類推される。従って、その様な変異部位の組み合わせによって得られる改変酵素も、本発明における改変酵素に含まれる。

本発明において、改変酵素をコードする遺伝子とは、改変酵素を構成する2種のポリペプチド鎖を形成する事を特徴とする2つのアミノ酸配列乃至それらをコードする事を特徴とする2つのORFを成す塩基配列を指す。

本発明において、遺伝子を含む事を特徴とするプラスミドとは、改変酵素を構成する2種のポリペプチド鎖を形成する事を特徴とする2つのアミノ酸配列をコードする事を特徴とする2つのORFを成す塩基配列をその配列中に含有する事

を特徴とするプラスミドを指す。

上記のプラスミドは、本発明における遺伝子に加え、各遺伝子の発現に必要な制御領域及び自律複製に必要な領域等の、任意の宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体や細胞株による改変酵素の産生を可能せしめる構成を有する事が出来る。ここでいう任意の宿主細胞とは、後述の実施例の様にその一例として大腸菌が挙げられるが、これに限定されるものではなく、枯草菌等のバチルス属菌、酵母や放線菌等の他の微生物も用いる事が出来る。

発現に必要な制御領域としては、プロモーター配列（転写を制御するオペレーター配列を含む。）、リボゾーム結合配列（SD配列）、転写終結配列等を挙げる事が出来る。

具体的なプロモーター配列の例としては、大腸菌由来のトリプトファンオペロンの *trp* プロモーター・ラクトースオペロンの *lac* プロモーター・ラムダファージ由来の *P<sub>L</sub>* プロモーター及び *P<sub>R</sub>* プロモーターや、枯草菌由来のグルコン酸合成酵素プロモーター（*gnt*）、アルカリプロテアーゼプロモーター（*apr*）、中性プロテアーゼプロモーター（*npr*）、 $\alpha$ -アミラーゼプロモーター（*amy*）等が挙げられる。また、*tac* プロモーターや *trc* プロモーターのように人為的に設計・改良された配列も利用出来る。

リボゾーム結合配列としては、大腸菌由来や枯草菌由来又はロドコッカスやシュードノカルディア本来の配列が挙げられるが、大腸菌や枯草菌等の所望の宿主細胞内で機能する配列であれば特に限定されるものではない。例えば、16SリボゾームRNAの3'末端領域に相補的な配列が4塩基以上連続したコンセンサス配列をDNA合成により作成してこれを利用してもよい。転写終結配列は必ずしも必要ではないが、 $\rho$  因子非依存性のもの、例えばリボプロテインターミネーター・*trp* オペロントーミネーター等が利用出来る。これら制御領域のプラスミド上での配列順序は、プロモーター配列とリボゾーム結合配列は本発明における遺伝子より5'末端側上流に位置する事が望ましく、転写終結配列は本発明における遺伝子より3'末端側下流に位置する事が望ましい。また、その様な制御領域により本発明における遺伝子を構成する各々のORFをコードする塩基配列が各々独立のシストロンとして発現されてもよいし、共通の制御領域によりポリ

シストロンとして発現されてもよい。

以上の要件を満たしているプラスミドベクターの例としては、大腸菌中での自律複製可能な領域を有している pBR322、pUC18、pBluescript、pKK223-3、pSC101 や、枯草菌中での自律複製可能な領域を有している pUB110、pTZ4、pC194、 $\rho$ 11、 $\phi$ 1、 $\phi$ 105 等を挙げる事が出来る。また、2種類以上の宿主細胞内での自律複製が可能なプラスミドベクターの例として、pHV14、TRp7、YEp7、pBS7 を挙げる事が出来る。

本発明における遺伝子を発現させて所望の活性を有するニトリルヒドラーゼを生産するに際しては、ニトリルヒドラーゼの活性化に関与する蛋白質が必要となる場合がある。

ニトリルヒドラーゼの活性化に関与する蛋白質とは、該蛋白質の発現の有無が、ニトリルヒドラーゼの活性化を直接左右する性質を有している蛋白質の事であり、特許文献4に記載されるシュードノカルディア サーモフィラ由来のニトリルヒドラーゼ活性化に関与する蛋白質（ニトリルヒドラーゼ活性化蛋白質）をその例として挙げる事が出来る。具体的には、ニトリルヒドラーゼ活性化蛋白質としては、配列番号102のアミノ酸配列に示される144個のアミノ酸の配列により構成されるものをその例として挙げる事が出来る。また、配列番号102のアミノ酸配列の一部でのアミノ酸の置換、挿入又は削除等により得られた異型蛋白質も、ニトリルヒドラーゼの活性化に関与するものであれば、ニトリルヒドラーゼ活性化蛋白質に含まれるものとする。この異型蛋白質としては、配列番号102のアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸の置換、挿入又は削除等による変異を有し、ニトリルヒドラーゼの活性化に関与する性質を維持しているものを挙げる事が出来る。

ニトリルヒドラーゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子としては、ニトリルヒドラーゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子であれば特に限定されるものではない。この遺伝子としては、上記の配列番号102のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子及び上記の異型蛋白質をコードする遺伝子を挙げる事が出来る。更に、このニトリルヒドラーゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子の好ま

しい例としては、配列番号103の塩基配列を有する遺伝子を挙げる事が出来る。更に、ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子には、配列番号103に記載の塩基配列配列の1個または2個以上について塩基の置換・挿入・削除が行われた配列であっても、それがニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子として機能する場合には、ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子の範囲に含まれるものとする。

ニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードする遺伝子を用いる場合としては、そのORFを本発明における遺伝子を成す2つのORFと共に、本発明におけるプラスミド中に含める例を挙げる事が出来る。その場合、これらORFのプラスミド上における順序は特に限定されず、また、3つのORFが同一の制御領域により制御されてもよく、2つのORFが同一の制御領域により制御され、残る1つのORFが他の2つとは異なる制御領域により制御されてもよく、3つのORFが各々異なる制御領域により制御されてもよい。

この様なベクタープラスミドに本発明における遺伝子を本発明における改変酵素の活性発現に必要な領域と共に挿入して本発明のプラスミドを構築する方法や該プラスミドを所望の宿主細胞に形質転換する方法及び該形質転換体内でニトリルヒドラターゼを産生させる方法には、例えば「Molecular Cloning 3rd Edition」(J. Sambrookら; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)等に記載されている分子生物学・生物工学・遺伝子工学の分野において公知の一般的な方法と宿主細胞が利用出来る。

本発明において、形質転換により得られる事を特徴とする形質転換体としては、本発明における遺伝子乃至プラスミドを用いて宿主細胞を形質転換する事により得られたものを含む。該形質転換体を培養する例としては、培養用の培地に植えた後、適当な培養温度(一般的には、20℃～50℃)で生育させる事を特徴とする方法が挙げられる。

尚、宿主細胞が微生物の場合、上記の形質転換体を培養する培地としてLB培地やM9培地などが一般的に用いられるが、そのような培地成分に金属イオンを添加しても良い。添加する金属イオンとしては、Feイオン及びCoイオンが挙

げられる。また、添加量としては、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の添加が例として挙げられる。

本発明において、形質転換体を培養して得られる培養液、細胞、又はそれらの処理物から改変酵素を回収する工程を含む事を特徴とする改変酵素の調製方法としては、上記の形質転換体、該形質転換体の培養液、又は該形質転換体や該培養液の処理物からニトリルヒドラーゼ活性を回収する工程を有する特徴のある例を挙げる事が出来る。

本発明において、ニトリル化合物を対応するアミド化合物へと転化させる工程を含む事を特徴とするアミド化合物製造方法としては、上記の形質転換体、該形質転換体の培養液、または該形質転換体や該培養液の処理物、又は上記調製方法によって回収したニトリルヒドラーゼ活性を触媒として用いて、ニトリル化合物を対応するアミド化合物に変換する工程を有する特徴のある例を挙げる事が出来る。

本発明における改変酵素又は該酵素活性を有する形質転換体を利用して、ニトリル化合物から対応するアミド化合物を製造する例としては、所望のニトリル化合物を、該酵素精製物や粗酵素調製物、本発明における形質転換体の培養液、培養液から得られる形質転換体、又は形質転換体の処理物と溶媒中で接触させる工程を含む方法が挙げられる。ここでいう処理物とは、該形質転換体からの抽出物や磨砕物、これらの抽出物や磨砕物のニトリルヒドラーゼ活性画分を分離して得られる粗酵素調製物、更に精製して得られる酵素精製物などの後分離物、該形質転換体や該形質転換体の抽出物、磨砕物または後分離物を適当な手段を用いて固定化した固定化物を含む。接触させる温度は特に限定されないが、好ましくは該ニトリルヒドラーゼが失活しない温度範囲内であり、より好ましくは氷点以上 $60^{\circ}\text{C}$ 以下である。

ニトリル化合物としては、本発明の改良酵素が基質として作用できる化合物であれば特に限定されないが、アセトニトリル・プロピオニトリル・アクリロニトリル・メタクリロニトリル・*n*-ブチロニトリル・イソブチロニトリル・クロトノニトリル・ $\alpha$ -ヒドロキシイソブチロニトリル等といった炭素数2~4のニトリル化合物がその例として挙げられる。該ニトリル化合物の溶媒中での濃度は、

特に限定されるものではなく、また、反応温度も特に限定されないが、好ましくは該ニトリルヒドラターゼが失活しない温度範囲内であり、より好ましくは氷点以上50℃以下である。

以下に記載する実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例によって何等限定されるものではない。尚、各実施例及び比較例におけるHPLC分析は、カラムとして日本分光製のFinepak SIL C18-5 (250×4.6φmm)を用い、4体積%のアセトニトリルを含む10mMリン酸水溶液を展開液として使用した。また、アクリルアミド、アクリロニトリル・アクリル酸・メタクリルアミド・メタクリロニトリル・メタクリル酸は210nmの吸光度により検出した。

[参考例1] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (1)

αサブユニットの6番目のLeuをMetに置換するために、宝酒造社製の「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を用いた部位特異的な変異導入を行った。以後、「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を単にキットと呼ぶ。以下の参考例では、基本的にキットの原理及び操作方法を踏襲した。

30mLの試験管に10mLのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mLとなるようにアンピシリンを添加した後、MT-10822を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mLを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により該菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドpPT-DB1を調製した。

各々10ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：7記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号：8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μLの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配

列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。Microcon100（宝酒造社製）を用いてそれぞれのPCR反応終了液より過剰なプライマー及びdNTPを除去した後、TEを加えて各々50  $\mu$ Lの溶液を調製した。該TE溶液を各0.5  $\mu$ Lずつ含む全量47.5  $\mu$ Lのアニーリング溶液（組成はキットに記載の条件による）を調製し、熱変性処理（98 $^{\circ}$ C）を10分間行った後、37 $^{\circ}$ Cまで60分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて37 $^{\circ}$ Cで15分間保持することによってアニーリング処理を行った。アニーリング処理液にTaKaRa LA Taqを0.5  $\mu$ L加えて72 $^{\circ}$ Cで3分間加熱処理を行い、ヘテロ2本鎖を完成させた。これにM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol加えて全量を50  $\mu$ Lとした後、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことによるPCR反応No. 3を行った。PCR反応No. 3の反応終了液5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（シグマ社製タイプV11低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約2 kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約2 KbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片（約0.1 g）を細かく粉碎し1 mLのTE溶液に懸濁後、55 $^{\circ}$ Cで1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10  $\mu$ LのTEに溶解した。精製した約2 kbの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びHindIIIにより切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10  $\mu$ LのTEに溶解した。同様に、EcoRI及びHindIIIによりpPT-DB1を切断し、アガロースゲル電気泳動

(シグマ社製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約2.7KbのDNA断片のみを切り出した。切り出したアガロース片(約0.1g)を細かく粉碎し1mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10μLのTEに溶解した。この様にして得られた約2kbと約2.7KbのDNA断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させた後、大腸菌HB101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体No.1を得た。

得られた形質転換体を用いたアミド化合物の製造における転化率及び選択率を以下の方法により求めた。

500mLのバッフル付三角フラスコに40μg/mLの硫酸第二鉄・七水和物及び10μg/mLの塩化コバルト・二水和物を含む100mLのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mLとなるようにアンピシリンを添加した後、形質転換体No.1を一白金耳植菌し、37℃・130rpmにて約20時間培養した。該培養終了液から遠心分離(5000G×15分)により菌体を分離した。続いて、分離した該菌体を50mLの生理食塩水に再懸濁した後に、再度遠心分離(5000G×15分)により菌体を分離した。該菌体0.1gを20mLの50mMリン酸カリウム水溶液(pH7.0)に懸濁し、これに1mLのアクリロニトリル又はメタアクリロニトリルを添加して10℃で緩やかに攪拌しながら1時間反応させた。反応終了後、HPLCを用いて反応液の分析を行った結果、反応液中には添加したニトリル化合物(アクリロニトリル又はメタアクリロニトリル)に相当するモル量のアミド化合物(アクリルアミド又はメタアクリルアミド)のみが存在しており、ニトリル化合物(アクリロニトリル又はメタアクリロニトリル)及び対応する有機酸(アクリル酸又はメタアクリル酸)の存在は認められなかった。すなわち、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用

いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表1に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの6番目のLeuがMetに置換されていた。

[表1]

表1

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 1	$\alpha$ -6番目	Leu	Met	CTG	ATG

[参考例2] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (2)

$\alpha$ サブユニットの6番目のLeuをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：11記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、PCR反応No. 2を含む参考例1における操作と全く同じ操作により、形質転換体No. 2を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、100%であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 2 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\alpha$  サブユニットの 6 番目の Leu が Thr に置換されていた。

[表 2]

表 2

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 2	$\alpha$ -6 番目	Leu	Thr	CTG	ACG

[参考例 3] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3)

$\alpha$  サブユニットの 6 番目の Leu を Ala に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：12 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応

終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 3を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表3に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの6番目のLeuがAlaに置換されていた。

[表3]

表3

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 3	$\alpha$ -6番目	Leu	Ala	CTG	GCG

[参考例4] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（4）

$\alpha$ サブユニットの6番目のLeuをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：13記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及

びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 4を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表4に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの6番目のLeuがValに置換されていた。

[表4]

表4

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 4	$\alpha$ -6番目	Leu	Val	CTG	GTG

[参考例5] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (5)

$\alpha$ サブユニットの19番目のAlaをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：14記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件

による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号:9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号:10に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50 µLの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 µLを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 5を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表5に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのαサブユニットの19番目のAlaがValに置換されていた。

[表5]

表5

クローン番号	変異箇所 (αサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 5	α-19番目	Ala	Val	GCG	GTG

[参考例6] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(6)

αサブユニットの38番目のMetをLeuに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型と

して2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：15記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 6を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表6に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの38番目のMetがLeuに置換されていた。

[表6]

表6

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 6	$\alpha$ -38番目	Met	Leu	ATG	TTG

[参考例7] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (7)  
 $\alpha$ サブユニットの77番目のThrをSerに置換するために、pPT-DB

1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：16記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 7を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表7に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのαサブユニットの77番目のThrがSerに置換されていた。

[表 7]

表 7

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 7	$\alpha$ -77番目	Thr	Ser	ACC	TCC

[参考例 8] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (8)

$\alpha$ サブユニットの90番目のGlyをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：17記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 8を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用

いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表8に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの90番目のGlyがAlaに置換されていた。

[表8]

表8

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 8	$\alpha$ -90番目	Gly	Ala	GGC	GCC

[参考例9] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (9)

$\alpha$ サブユニットの102番目のValをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：18記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 9を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表9に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの102番目のValがAlaに置換されていた。

[表9]

表9

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 9	$\alpha$ -102番目	Val	Ala	GTC	GCC

[参考例10] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (10)

$\alpha$ サブユニットの106番目のValをIleに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：19記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応

終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 10を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表10に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの $\alpha$ サブユニットの106番目のValがIleに置換されていた。

[表10]

表10

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 10	$\alpha$ -106番目	Val	Ile	GTC	ATC

[参考例11] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（11）

$\alpha$ サブユニットの126番目のPheをTyrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：20記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR

反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 11を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表11に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrに置換されていた。

[表11]

表11

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 11	$\alpha$ -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC

[参考例12] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（1. 2）

$\alpha$ サブユニットの130番目のGlnをGluに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：

21記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 12を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表12に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの $\alpha$ サブユニットの130番目のGlnがGluに置換されていた。

[表12]

表12

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 12	$\alpha$ -130番目	Gln	Glu	CAG	GAG

[参考例13] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（13）

$\alpha$ サブユニットの142番目のLeuをValに置換するために、pPT-D

B1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：22記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 13を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表13に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのαサブユニットの142番目のLeuがValに置換されていた。

[表 1 3]

表 1 3

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 13	$\alpha$ -142番目	Leu	Val	CTG	GTG

[参考例 1 4] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (14)

$\alpha$ サブユニットの146番目のGluをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：23記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 14を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続い

て、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表14に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの146番目のGluがAspに置換されていた。

[表14]

表14

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 14	$\alpha$ -146番目	Glu	Asp	GAG	GAC

[参考例15] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (15)

$\alpha$ サブユニットの187番目のAlaをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：24記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。

。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 15 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 15 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの  $\alpha$  サブユニットの 187 番目の Ala が Thr に置換されていた。

[表 15]

表 15

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 15	$\alpha$ -187 番目	Ala	Thr	GCC	ACC

[参考例 16] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (16)

$\alpha$  サブユニットの 194 番目の Ser を Leu に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：25 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 p

mol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 16 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 16 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\alpha$  サブユニットの 194 番目の Ser が Leu に置換されていた。

[表 16]

表 16

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 16	$\alpha$ -194 番目	Ser	Leu	TCG	TTG

[参考例 17] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（17）

$\alpha$  サブユニットの 203 番目の Ala を Glu に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：26 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件

による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号:9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号:10に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50 µLの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 µLを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 17を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表17に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのαサブユニットの203番目のAlaがGluに置換されていた。

[表17]

表17

クローン番号	変異箇所 (αサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 17	α-203番目	Ala	Glu	GCG	GAG

[参考例18] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(18)

βサブユニットの20番目のAlaをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：27記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 18を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表18に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの20番目のAlaがValに変換されていた。

[表18]

表18

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 18	$\beta$ -20番目	Ala	Val	GCG	GTG

[参考例19] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（1

9)

$\beta$ サブユニットの21番目のAspをAsnに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：28記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 19を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表19に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの21番目のAspがAsnに置換されていた。

[表 19]

表 19

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 19	$\beta$ -21番目	Asp	Asn	GAC	AAC

[参考例 20] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (20) .

$\beta$ サブユニットの108番目のGluをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：29記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 20を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続い

て、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表20に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの108番目のGluがAspに置換されていた。

[表20]

表20

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 20	$\beta$ -108番目	Glu	Asp	GAG	GAT

[参考例21] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (21)

$\beta$ サブユニットの108番目のGluをProに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：30記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。

。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 21 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケエンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 21 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットの 108 番目の Glu が Pro に置換されていた。

[表 21]

表 21

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 21	$\beta$ -108 番目	Glu	Pro	GAG	CCG

[参考例 22] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (22)

$\beta$  サブユニットの 108 番目の Glu を Ser に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：31 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 p

mol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 22 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 22 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットの 108 番目の Glu が Ser に置換されていた。

[表 22]

表 22

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 22	$\beta$ - 108 番目	Glu	Ser	GAG	TCG

[参考例 23] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（23）

$\beta$  サブユニットの 108 番目の Glu を Arg に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：32 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件

による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号:9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号:10に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50 µLの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 µLを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 23を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表23に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのβサブユニットの108番目のGluがArgに置換されていた。

[表23]

表23

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 23	β-108番目	Glu	Arg	GAG	CGG

[参考例24] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(24)

βサブユニットの108番目のGluをCysに置換するために、pPT-D B1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：33記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 24を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表24に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの108番目のGluがCysに置換されていた。

[表24]

表24

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 24	$\beta$ -108番目	Glu	Cys	GAG	TGC

[参考例25] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（2

5)

$\beta$ サブユニットの108番目のGluをLeuに置換するために、pP T-D B1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpP T-D B1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：34記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 25を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表25に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの108番目のGluがLeuに置換されていた。

[表 2 5]

表 2 5

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 25	$\beta$ -108番目	G l u	L e u	G A G	C T G

[参考例 2 6] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (26)

$\beta$ サブユニットの108番目のG l uをT h rに置換するために、p P T-D B 1プラスミドDNAを鋳型として、参考例 1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例 1で調製したp P T-D B 1のプラスミドDNA 10 n gを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：35記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 p m o l含む全量50  $\mu$  Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 p m o l含む全量50  $\mu$  Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$  Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例 1と全く同じ操作により、形質転換体No. 26を得た。

次に、参考例 1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続い

て、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表26に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの108番目のGluがThrに置換されていた。

[表26]

表26

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 26	$\beta$ -108番目	Glu	Thr	GAG	ACG

[参考例27] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (27)

$\beta$ サブユニットの200番目のAlaをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：36記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。

。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 27 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 27 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットの 200 番目の Ala が Asp に置換されていた。

[表 27]

表 27

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 27	$\beta$ -200 番目	Ala	Asp	GCC	GAC

[参考例 28] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (28)

$\beta$  サブユニットの 200 番目の Ala を Ile に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：37 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 p

mol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 28 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 28 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットの 200 番目の Ala が Ile に置換されていた。

[表 28]

表 28

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 28	$\beta$ -200 番目	Ala	Ile	GCC	ATC

[参考例 29] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (29)

$\beta$  サブユニットの 200 番目の Ala を Val に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、参考例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：38 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件

による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号:9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号:10に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50 µLの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 µLを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 29を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表29に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのβサブユニットの200番目のAlaがValに置換されていた。

[表29]

表29

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 29	β-200番目	Ala	Val	GCC	GTC

[参考例30] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(30)

βサブユニットの200番目のAlaをGluに置換するために、pPT-D B1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 n g を各々鑄型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：39 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 p m o l 含む全量 50  $\mu$  L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反応（72℃）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M 1 3 プライマー R V（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 p m o l 含む全量 50  $\mu$  L の系（組成はキットに記載の条件による）で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$  L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 30 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 30 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 200 番目の A l a が G l u に置換されていた。

[表 30]

表 30

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 30	$\beta$ -200 番目	A l a	G l u	G C C	G A G

[参考例 31] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（3

1)

$\beta$ サブユニットの212番目のSerをTyrに置換するために、pP T-D B1プラスミドDNAを鋳型として、参考例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

参考例1で調製したpP T-D B1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：40記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 31を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表31に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの212番目のSerがTyrに置換されていた。

[表 3 1]

表 3 1

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 31	$\beta$ -212番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

[参考例 3 2] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 2)

クローン No. 5 のアミノ酸変異 ( $\alpha$  サブユニットの 19 番目: Ala が Val) とクローン No. 11 のアミノ酸変異 ( $\alpha$  サブユニットの 126 番目: Phe が Tyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121°C・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100  $\mu$ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 11 で得られたクローン No. 11 を一白金耳植菌し、37°C・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 11 のプラスミド DNA を調製した。

クローン No. 11 のプラスミド DNA 1  $\mu$ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 14 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$

1の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 32を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表32に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの19番目のAlaがValに、 $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表32]

表32

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 32	$\alpha$ -19番目	Ala	Val	GCG	GTG
	$\alpha$ -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC

[参考例33] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（33）

クローンNo. 1のアミノ酸変異（ $\alpha$ サブユニットの6番目：LeuがMet）とクローンNo. 32のアミノ酸変異（ $\alpha$ サブユニットの19番目のAlaがVal； $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyr）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30 ml の試験管に10 ml のLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100  $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例32で得られたクローンNo. 32を白金耳植菌し、37℃・300 rpmにて約20時間培養した。該培養液1 mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000 rpm×5分）により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 32のプラスミドDNAを調製した。

クローンNo. 32のプラスミドDNA 1  $\mu$ gを鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：7記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 33を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表33に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの6番目のLeuがMetに、 $\alpha$ サブユニットの19番目のAlaがValに、 $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表 3 3]

表 3 3

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 33	$\alpha$ -6 番目	Leu	Met	CTG	ATG
	$\alpha$ -19 番目	Ala	Val	GCG	GTG
	$\alpha$ -126 番目	Phe	Tyr	TTC	TAC

[参考例 3 4] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 4)

クローン No. 2 のアミノ酸変異 ( $\alpha$ サブユニットの 6 番目: Leu が Thr) とクローン No. 32 のアミノ酸変異 ( $\alpha$ サブユニットの 19 番目の Ala が Val;  $\alpha$ サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

参考例 3 3 で調製したクローン No. 32 のプラスミド DNA 1  $\mu$ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 11 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認でき

た。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 34 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 34 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの  $\alpha$  サブユニットの 6 番目の Leu が Thr に、 $\alpha$  サブユニットの 19 番目の Ala が Val に、 $\alpha$  サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr にそれぞれ置換されていた。

[表 34]

表 34

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 34	$\alpha$ -6 番目	Leu	Thr	CTG	ACG
	$\alpha$ -19 番目	Ala	Val	GCG	GTG
	$\alpha$ -126 番目	Phe	Tyr	TTC	TAC

[参考例 35] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (35)

クローン No. 3 のアミノ酸変異 ( $\alpha$  サブユニットの 6 番目: Leu が Ala) とクローン No. 32 のアミノ酸変異 ( $\alpha$  サブユニットの 19 番目の Ala が Val;  $\alpha$  サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

参考例 33 で調製したクローン No. 32 のプラスミド DNA 1  $\mu$ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号:

12記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$  lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$  lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$  lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 35を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表35に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの6番目のLeuがAlaに、 $\alpha$ サブユニットの19番目のAlaがValに、 $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表 3 5]

表 3 5

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 35	$\alpha$ -6 番目	Leu	Ala	CTG	GCG
	$\alpha$ -19 番目	Ala	Val	GCG	GTG
	$\alpha$ -126 番目	Phe	Tyr	TTC	TAC

[参考例 3 6] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 6)

クローン No. 20 のアミノ酸変異 ( $\beta$  サブユニットの 108 番目: Glu が Asp) とクローン No. 31 のアミノ酸変異 ( $\beta$  サブユニットの 212 番目: Ser が Tyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121°C・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100  $\mu$ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 31 で得られたクローン No. 31 を一白金耳植菌し、37°C・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 31 のプラスミド DNA を調製した。

クローン No. 31 のプラスミド DNA 1  $\mu$ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 29 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MU

T4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 36を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表36に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの108番目のGluがAspに、 $\beta$ サブユニットの212番目のSerがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表36]

表36

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 36	$\beta$ -108番目	Glu	Asp	GAG	GAT
	$\beta$ -212番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

[参考例37] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（37）

クローンNo. 23のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの108番目：GluがArg）とクローンNo. 31のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの212番目：SerがTyr）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラタ

ーゼ活性が保持されていることを確認した。

参考例 36 で調製したクローン No. 31 のプラスミド DNA 1  $\mu$ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：32 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反応（72℃）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M13 プライマー RV（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ l を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 37 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 37 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 108 番目の Glu が Arg に、 $\beta$  サブユニットの 212 番目の Ser が Tyr にそれぞれ置換されていた。

[表 3 7]

表 3 7

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 37	$\beta$ -108番目	G l u	A r g	G A G	C G G
	$\beta$ -212番目	S e r	T y r	T C C	T A C

[参考例 3 8] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (3 8)

クローン No. 27 のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの 200 番目: A l a が A s p) とクローン No. 31 のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの 212 番目: S e r が T y r) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

参考例 36 で調製したクローン No. 31 のプラスミド DNA 1  $\mu$ g を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 36 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、参考例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 38 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表38に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの200番目のAlaがAspに、 $\beta$ サブユニットの212番目のSerがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表38]

表38

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 38	$\beta$ -200番目	Ala	Asp	GCC	GAC
	$\beta$ -212番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

[参考例39] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (39)

クローンNo. 30のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの200番目: AlaがGlu) とクローンNo. 31のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの212番目: SerがTyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

参考例36で調製したクローンNo. 31のプラスミドDNA1 $\mu$ gを鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番39記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 $\mu$ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM

13 プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了後各5  $\mu$ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、参考例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 39を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表39に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの200番目のAlaがGluに、 $\beta$ サブユニットの212番目のSerがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表39]

表39

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 39	$\beta$ -200番目	Ala	Glu	GCC	GAG
	$\beta$ -212番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

[実施例1] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（40）

$\alpha$ サブユニットの36番目のThrをMetに置換するために、宝酒造社製の「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を用いた部位特異的な変異導入を行った。以後、「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を単にキットと呼ぶ。以下の実施例では、基本的にキ

ットの原理及び操作方法を踏襲した。

30 mLの試験管に10 mLのLB液体培地を調製し、121°C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 µg/mLとなるようにアンピシリンを添加した後、MT-10822を一白金耳植菌し、37°C・300 rpmにて約20時間培養した。該培養液1 mLを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000 rpm×5分）により該菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドpPT-DB1を調製した。

各々10 ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：41記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 µLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98°C）15秒、アニーリング（55°C）30秒、伸長反応（72°C）120秒の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50 µLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 µLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。Microcon100（宝酒造社製）を用いてそれぞれのPCR反応終了液より過剰なプライマー及びdNTPを除去した後、TEを加えて各々50 µLの溶液を調製した。該TE溶液を各0.5 µLずつ含む全量47.5 µLのアニーリング溶液（組成はキットに記載の条件による）を調製し、熱変性処理（98°C）を10分間行った後、37°Cまで60分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて37°Cで15分間保持することによってアニーリング処理を行った。アニーリング処理液にTaKaRa LA Taqを0.5 µL加えて72°Cで3分間加熱処理を行い、ヘテロ2本鎖を完成させた。これにM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol

1 加えて全量を 50  $\mu$ L とした後、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことによる PCR 反応 No. 3 を行った。PCR 反応 No. 3 の反応終了液 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 0.8 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、約 2 kb の増幅 DNA 産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約 2 kb の DNA 断片のみを切り出し、該アガロース片 (約 0.1 g) を細かく粉砕し 1 mL の TE 溶液に懸濁後、55 $^{\circ}$ C で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 DNA 断片を精製し、最終的に 10  $\mu$ L の TE に溶解した。精製した約 2 kb の増幅 DNA 断片を制限酵素 EcoRI 及び HindIII により切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 DNA 断片を精製し、最終的に 10  $\mu$ L の TE に溶解した。同様に、EcoRI 及び HindIII により pPT-DB1 を切断し、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 0.7%) を行い、アガロースゲルから約 2.7 kb の DNA 断片のみを切り出した。切り出したアガロース片 (約 0.1 g) を細かく粉砕し 1 mL の TE 溶液に懸濁後、55 $^{\circ}$ C で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該 DNA 断片を精製し、最終的に 10  $\mu$ L の TE に溶解した。この様にして得られた約 2 kb と約 2.7 kb の DNA 断片を DNA ライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて連結させた後、大腸菌 HB101 のコンピテントセル (東洋紡績社製) を形質転換し、形質転換体 No. 40 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 40 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\alpha$  サ

プユニットの36番目のThrがMetに置換されている事を確認した。

[表40]

表40

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 40	$\alpha$ -36番目	Thr	Met	ACG	ATG

[実施例2] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(41)

$\alpha$ サブユニットの71番目のArgをHisに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：42記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 41を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続い

て、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表41に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの71番目のArgがHisに置換されている事を確認した。

[表41]

表41

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 41	$\alpha$ -71番目	Arg	His	CGT	CAT

[実施例3] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (42)

$\alpha$ サブユニットの148番目のGlyをAspに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：43記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 42を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 42 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\alpha$  サブユニットの 148 番目の Gly が Asp に置換されている事を確認した。

[表 42]

表 42

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 42	$\alpha$ -148 番目	Gly	Asp	GGC	GAC

[実施例 4] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (43)

$\alpha$  サブユニットの 204 番目の Val を Arg に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：44 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応

終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 43 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケエンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 43 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの  $\alpha$  サブユニットの 204 番目の Val が Arg に置換されている事を確認した。

[表 43]

表 43

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 43	$\alpha$ -204 番目	Val	Arg	GTC	CGC

[実施例 5] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（44）

$\alpha$  サブユニットの 204 番目の Val を Lys に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：45 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反応（72℃）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及

びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 44を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表44に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの204番目のValがLysに置換されている事を確認した。

[表44]

表44

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 44	$\alpha$ -204番目	Val	Lys	GTC	AAA

[実施例6] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（45）

$\alpha$ サブユニットの204番目のValをTrpに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：46記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件

による)で、熱変性(98℃)15秒、アニーリング(55℃)30秒、伸長反応(72℃)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号:9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号:10に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50 µLの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 µLを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 45を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表45に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのαサブユニットの204番目のValがTrpに置換されている事を確認した。

[表45]

表45

クローン番号	変異箇所 (αサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 45	α-204番目	Val	Trp	GTC	TGG

[実施例7] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(46)

αサブユニットの204番目のValをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型と

して2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：47記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 46を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表46に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの $\alpha$ サブユニットの204番目のValがThrに置換されている事を確認した。

[表46]

表46

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 46	$\alpha$ -204番目	Val	Thr	GTC	ACC

[実施例8] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（47）

$\beta$ サブユニットの10番目のThrをAspに置換するために、pPT-DB

1 プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：48記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 47を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表47に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの10番目のThrがAspに置換されている事を確認した。

[表47]

表47

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 47	$\beta$ -10番目	Thr	Asp	ACC	GAC

[実施例 9] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (48)

$\beta$  サブユニットの 10 番目の Thr を Glu に置換するために、pP T-DB 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pP T-DB 1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：49 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 48 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 48 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 10 番目の Thr が Glu に置換されている事を確認した。

[表 48]

表 48

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 48	$\beta$ -10番目	Thr	Glu	ACC	GAA

[実施例10] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (49)

$\beta$ サブユニットの10番目のThrをTrpに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 50記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15秒、アニーリング (55°C) 30秒、伸長反応 (72°C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度1.0重量%) によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 49を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用

いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表49に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの10番目のThrがTrpに置換されている事を確認した。

[表49]

表49

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 49	$\beta$ -10番目	Thr	Trp	ACC	TGG

[実施例11] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（50）

$\beta$ サブユニットの10番目のThrをGlyに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：51記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 50を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表50に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットの10番目のThrがGlyに置換されている事を確認した。

[表50]

表50

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 50	$\beta$ -10番目	Thr	Gly	ACC	GGC

[実施例12] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (51)

$\beta$ サブユニットの10番目のThrをTyrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：52記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 51を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表51に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットの10番目のThrがTyrに置換されている事を確認した。

[表51]

表51

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 51	$\beta$ -10番目	Thr	Tyr	ACC	TAC

[実施例13] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (52)

$\beta$ サブユニットの10番目のThrをCysに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：53記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50p

mol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 52 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 52 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 10 番目の Thr が Cys に置換されている事を確認した。

[表 52]

表 52

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 52	$\beta$ - 10 番目	Thr	Cys	ACC	TGC

[実施例 14] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（53）

$\beta$  サブユニットの 32 番目の Val を Gly に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：54 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反

応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 53を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表53に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの32番目のValがGlyに置換されている事を確認した。

[表53]

表53

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 53	$\beta$ -32番目	Val	Gly	GTC	GGC

[実施例15] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（54）

$\beta$ サブユニットの37番目のPheをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：

55記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 54を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表54に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの37番目のPheがThrに置換されている事を確認した。

[表54]

表54

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 54	$\beta$ -37番目	Phe	Thr	TTC	ACC

[実施例16] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（55）

$\beta$ サブユニットの37番目のPheをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変

異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：56記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 55を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表55に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの37番目のPheがAlaに置換されている事を確認した。

[表55]

表55

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 55	β-37番目	Phe	Ala	TTC	GCC

[実施例17] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（5

6)

$\beta$ サブユニットの37番目のPheをLeuに置換するために、pP T-DB 1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpP T-DB 1のプラスミドDNA 10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：57記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 56を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表56に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの37番目のPheがLeuに置換されている事を確認した。

[表 5 6]

表 5 6

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 56	$\beta$ -37番目	P h e	L e u	T T C	C T C

[実施例 18] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (57)

$\beta$ サブユニットの37番目のP h eをI l eに置換するために、p P T-D B 1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したp P T-D B 1のプラスミドDNA 10 n gを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：58記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 p m o l含む全量50  $\mu$  Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 p m o l含む全量50  $\mu$  Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$  Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 57を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用

いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表57に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの37番目のPheがIleに置換されている事を確認した。

[表57]

表57

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 57	$\beta$ -37番目	Phe	Ile	TTC	ATC

[実施例19] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（58）

$\beta$ サブユニットの37番目のPheをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：59記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 58を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表58に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットの37番目のPheがValに置換されている事を確認した。

[表58]

表58

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 58	$\beta$ -37番目	Phe	Val	TTC	GTC

[実施例20] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（59）

$\beta$ サブユニットの41番目のPheをGluに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：60記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 59を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表59に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの41番目のPheがGluに置換されている事を確認した。

[表59]

表59

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 59	β-41番目	Phe	Glu	TTC	GAA

[実施例21] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (60)

βサブユニットの41番目のPheをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：61記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50p

mol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 60 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 60 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットの 41 番目の Phe が Thr に置換されている事を確認した。

[表 60]

表 60

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 60	$\beta$ - 41 番目	P h e	T h r	T T C	A C C

[実施例 22] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（61）

$\beta$  サブユニットの 41 番目の Phe を Ala に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：62 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反

応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 61を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表61に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの41番目のPheがAlaに置換されている事を確認した。

[表61]

表61

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 61	$\beta$ -41番目	Phe	Ala	TTC	GCC

[実施例23] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（62）

$\beta$ サブユニットの41番目のPheをLeuに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：

63記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 62を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表62に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの41番目のPheがLeuに置換されている事を確認した。

[表62]

表62

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 62	$\beta$ -41番目	Phe	Leu	TTC	CTC

[実施例24] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（63）

$\beta$ サブユニットの41番目のPheをIleに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変

異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：64記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 63を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表63に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのβサブユニットの41番目のPheがIleに置換されている事を確認した。

[表63]

表63

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 63	β-41番目	Phe	Ile	TTC	ATC

[実施例25] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（6

4)

$\beta$ サブユニットの41番目のPheをValに置換するために、pP T-D B 1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpP T-D B 1のプラスミドDNA 10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：65記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 64を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表64に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの41番目のPheがValに置換されている事を確認した。

[表 6 4]

表 6 4

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 64	$\beta$ -41番目	P h e	V a l	T T C	G T C

[実施例 2 6] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (65)

$\beta$ サブユニットの46番目のMetをGlyに置換するために、pP T-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpP T-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：66記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 65を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用

いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 6 5 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 4 6 番目の Met が Gly に置換されている事を確認した。

[表 6 5]

表 6 5

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 6 5	$\beta$ - 4 6 番目	Met	Gly	ATG	GGG

[実施例 2 7] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (6 6)

$\beta$  サブユニットの 4 6 番目の Met を Tyr に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：6 7 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8  $^{\circ}$  C) 1 5 秒、アニーリング (5 5  $^{\circ}$  C) 3 0 秒、伸長反応 (7 2  $^{\circ}$  C) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号：1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$  L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1. 0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 6 6 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表66に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのβサブユニットの46番目のMetがTyrに置換されている事を確認した。

[表66]

表66

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 66	β-46番目	Met	Tyr	ATG	TAT

[実施例28] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (67)

βサブユニットの46番目のMetをLeuに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：68記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 67を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表67に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットの46番目のMetがLeuに置換されている事を確認した。

[表67]

表67

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 67	$\beta$ -46番目	Met	Leu	ATG	CTG

[実施例29] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（68）

$\beta$ サブユニットの46番目のMetをLysに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：69記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50p

mol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 68 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 68 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 46 番目の Met が Lys に置換されている事を確認した。

[表 68]

表 68

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 68	$\beta$ -46 番目	Met	Lys	ATG	AAG

[実施例 30] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (69)

$\beta$  サブユニットの 46 番目の Met を Asp に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：70 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反

応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 69を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表69に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットの46番目のMetがAspに置換されている事を確認した。

[表69]

表69

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 69	$\beta$ -46番目	Met	Asp	ATG	GAT

[実施例31] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（70）

$\beta$ サブユニットの48番目のLeuをGlyに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：

71記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 70を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表70に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの48番目のLeuがGlyに置換されている事を確認した。

[表70]

表70

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 70	$\beta$ -48番目	Leu	Gly	CTG	GGG

[実施例32] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（71）

$\beta$ サブユニットの48番目のLeuをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変

異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：72記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 71を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表71に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのβサブユニットの48番目のLeuがAlaに置換されている事を確認した。

[表71]

表71

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 71	β-48番目	Leu	Ala	CTG	GCG

[実施例33] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（7

2)

$\beta$ サブユニットの48番目のLeuをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：73記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 72を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表72に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの48番目のLeuがValに置換されている事を確認した。

[表 7 2]

表 7 2

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 72	$\beta$ -48番目	Leu	Val	CTG	GTG

[実施例 3 4] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (73)

$\beta$ サブユニットの48番目のLeuをSerに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：74記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 73を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用

いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表73に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの48番目のLeuがSerに置換されている事を確認した。

[表73]

表73

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 73	$\beta$ -48番目	Leu	Ser	CTG	TCG

[実施例35] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (74)

$\beta$ サブユニットの48番目のLeuをThrに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：75記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 74を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表74に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの48番目のLeuがThrに置換されている事を確認した。

[表74]

表74

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 74	$\beta$ -48番目	Leu	Thr	CTG	ACG

[実施例36] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (75)

$\beta$ サブユニットの48番目のLeuをArgに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：76記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 75を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表75に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのβサブユニットの48番目のLeuがArgに置換されている事を確認した。

[表75]

表75

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 75	β-48番目	Leu	Arg	CTG	CGG

[実施例37] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(76)

βサブユニットの51番目のPheをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：77記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50p

mol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 76 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 76 に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットの 51 番目の Phe が Ala に置換されている事を確認した。

[表 76]

表 76

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 76	$\beta$ -51 番目	Phe	Ala	TTC	GCC

[実施例 38] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（77）

$\beta$  サブユニットの 51 番目の Phe を Val に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：78 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反

応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 77を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表77に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの51番目のPheがValに置換されている事を確認した。

[表77]

表77

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 77	$\beta$ -51番目	Phe	Val	TTC	GTC

[実施例39] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（78）

$\beta$ サブユニットの72番目のTrpをPheに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：

79記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1：0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 78を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表78に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの72番目のTrpがPheに置換されている事を確認した。

[表78]

表78

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 78	$\beta$ -72番目	Trp	Phe	TGG	TTT

[実施例40] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（79）

$\beta$ サブユニットの118番目のPheをAlaに置換するために、pPT-D B1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な

変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA 10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：80記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 79を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表79に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの118番目のPheがAlaに置換されている事を確認した。

[表79]

表79

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 79	$\beta$ -118番目	Phe	Ala	TTC	GCC

[実施例41] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（8

0)

$\beta$ サブユニットの118番目のPheをLeuに置換するために、pP T-D B1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpP T-D B1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：81記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 80を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表80に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの118番目のPheがLeuに置換されている事を確認した。

[表 80]

表 80

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 80	$\beta$ -118番目	Phe	Leu	TTC	CTC

[実施例 42] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (81)

$\beta$ サブユニットの118番目のPheをIleに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：82記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 81を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用

いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 8 1 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 1 1 8 番目の P h e が I l e に置換されている事を確認した。

[表 8 1]

表 8 1

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 8 1	$\beta$ - 1 1 8 番目	P h e	I l e	T T C	A T C

[実施例 4 3] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (8 2)

$\beta$  サブユニットの 1 1 8 番目の P h e を V a l に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：8 3 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8  $^{\circ}$  C) 1 5 秒、アニーリング (5 5  $^{\circ}$  C) 3 0 秒、伸長反応 (7 2  $^{\circ}$  C) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号：1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$  L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1. 0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 8 2 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表82に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの118番目のPheがValに置換されている事を確認した。

[表82]

表82

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 82	$\beta$ -118番目	Phe	Val	TTC	GTC

[実施例44] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (83)

$\beta$ サブユニットの127番目のLeuをAlaに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：84記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 83を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表83に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのβサブユニットの127番目のLeuがAlaに置換されている事を確認した。

[表83]

表83

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 83	β-127番目	Leu	Ala	CTG	GCG

[実施例45] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (84)

βサブユニットの127番目のLeuをValに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：85記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50p

mol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 84 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 84 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 127 番目の Leu が Val に置換されている事を確認した。

[表 84]

表 84

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 84	$\beta$ -127 番目	Leu	Val	CTG	GTG

[実施例 46] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（85）

$\beta$  サブユニットの 127 番目の Leu を Ser に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：86 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反

応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 85を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表85に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットの127番目のLeuがSerに置換されている事を確認した。

[表85]

表85

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 85	$\beta$ -127番目	Leu	Ser	CTG	TCG

[実施例47] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（86）

$\beta$ サブユニットの146番目のArgをGlyに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：

87記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 86を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表86に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの146番目のArgがGlyに置換されている事を確認した。

[表86]

表86

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 86	$\beta$ -146番目	Arg	Gly	CGG	GGG

[実施例48] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（87）

$\beta$ サブユニットの160番目のArgをLeuに置換するために、pPT-D B1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な

変異導入を行った。

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 10 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：88 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 p m o l 含む全量 50  $\mu$  L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反応（72℃）120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 No. 2 は、M U T 4 プライマー（配列表の配列番号：9 に配列を記載）及び M 1 3 プライマー R V（配列表の配列番号：10 に配列を記載）を各々 50 p m o l 含む全量 50  $\mu$  L の系（組成はキットに記載の条件による）で、P C R 反応 No. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$  L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量％）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 87 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100％であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 87 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 160 番目の A r g が L e u に置換されている事を確認した。

[表 87]

表 87

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 87	$\beta$ -160 番目	A r g	L e u	C G G	C T G

[実施例 49] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（8

8)

$\beta$ サブユニットの160番目のArgをTrpに置換するために、pP T-D B1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpP T-D B1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：89記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 88を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表88に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの160番目のArgがTrpに置換されている事を確認した。

[表 8 8]

表 8 8

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 88	$\beta$ -160番目	Arg	Trp	CGG	TGG

[実施例 50] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (89)

$\beta$  サブユニットの 186 番目の Leu を Glu に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：90 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒、アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒、伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 89 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用

いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 8 9 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 1 8 6 番目の L e u が G l u に置換されている事を確認した。

[表 8 9]

表 8 9

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
N o. 8 9	$\beta$ - 1 8 6 番目	L e u	G l u	C T G	G A G

[実施例 5 1] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (9 0)

$\beta$  サブユニットの 1 8 6 番目の L e u を A s p に置換するために、p P T - D B 1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した p P T - D B 1 のプラスミド DNA 1 0 n g を各々鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 N o. 1 は、配列表の配列番号：9 1 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8  $^{\circ}$  C) 1 5 秒、アニーリング (5 5  $^{\circ}$  C) 3 0 秒、伸長反応 (7 2  $^{\circ}$  C) 1 2 0 秒の条件を 2 5 サイクル繰り返すことにより行った。P C R 反応 N o. 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号：1 0 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 N o. 1 と同様の操作により行った。P C R 反応 N o. 1 及び N o. 2 の反応終了液各 5  $\mu$  L を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1. 0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 N o. 9 0 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表90に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのβサブユニットの186番目のLeuがAspに置換されている事を確認した。

[表90]

表90

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 90	β-186番目	Leu	Asp	CTG	GAT

[実施例52] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (91)

βサブユニットの186番目のLeuをLysに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：92記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）に

よりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 91を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表91に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼのβサブユニットの186番目のLeuがLysに置換されている事を確認した。

[表91]

表91

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 91	β-186番目	Leu	Lys	CTG	AAG

[実施例53] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(92)

βサブユニットの186番目のLeuをArgに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：93記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50p

mol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 及び No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ L を用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 92 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 92 に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 186 番目の Leu が Arg に置換されている事を確認した。

[表 92]

表 92

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 92	$\beta$ -186 番目	Leu	Arg	CTG	CGG

[実施例 54] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（93）

$\beta$  サブユニットの 186 番目の Leu を Asn に置換するために、pPT-DB1 プラスミド DNA を鋳型として、実施例 1 と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例 1 で調製した pPT-DB1 のプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：94 記載のプライマー及び M13 プライマー M4（配列表の配列番号：8 に配列を記載）を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15 秒、アニーリング（55℃）30 秒、伸長反

応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 93を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表93に示したクローンにおいてニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットの186番目のLeuがAsnに置換されている事を確認した。

[表93]

表93

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 93	$\beta$ -186番目	Leu	Asn	CTG	AAC

[実施例55] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（94）

$\beta$ サブユニットの186番目のLeuをSerに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：

95記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 94を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表94に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの186番目のLeuがSerに置換されている事を確認した。

[表94]

表94

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 94	$\beta$ -186番目	Leu	Ser	CTG	TCG

[実施例56] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（95）

$\beta$ サブユニットの186番目のLeuをGlyに置換するために、pPT-D B1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な

変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：96記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5μLを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 95を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表95に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼのβサブユニットの186番目のLeuがGlyに置換されている事を確認した。

[表95]

表95

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 95	β-186番目	Leu	Gly	CTG	GGG

[実施例57] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（9

6)

$\beta$ サブユニットの217番目のAspをGlyに置換するために、pPT-DB1プラスミドDNAを鋳型として、実施例1と同様の操作により部位特異的な変異導入を行った。

実施例1で調製したpPT-DB1のプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：97記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒、アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒、伸長反応（72 $^{\circ}$ C）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1及びNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 96を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表96に示したクローンにおいてニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの217番目のAspがGlyに置換されている事を確認した。

[表 9 6]

表 9 6

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		置換前	置換後	置換前	置換後
No. 96	$\beta$ -217番目	A s p	G l y	G A C	G G C

[実施例 5 8] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (97)

クローン No. 40 のアミノ酸変異 ( $\alpha$ サブユニットの 36 番目: Thr が Met) とクローン No. 11 のアミノ酸変異 ( $\alpha$ サブユニットの 126 番目: Phe が Tyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121°C・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100  $\mu$ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 11 で得られたクローン No. 11 を一白金耳植菌し、37°C・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号: 41 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号: 8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15 秒、アニーリング (55°C) 30 秒、伸長反応 (72°C) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号: 9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号: 10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作によ

り行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 97を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表97に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの36番目のThrがMetに、 $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表97]

表97

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 97	$\alpha$ -36番目 $\alpha$ -126番目	Thr Phe	Met Tyr	ACG TTC	ATG TAC

[実施例59] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（98）

クローンNo. 42のアミノ酸変異（ $\alpha$ サブユニットの148番目：GlyがAsp）とクローンNo. 43のアミノ酸変異（ $\alpha$ サブユニットの204番目：ValがArg）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121 $^{\circ}$ C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例4で得られたクローンNo. 43を一白金耳植菌し、37 $^{\circ}$ C・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを

適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000rpm×5分）により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA 10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：43記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$  lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$  lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$  lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 98を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表98に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの14番目のGlyがAspに、 $\alpha$ サブユニットの204番目のValがArgにそれぞれ置換されていた。

[表98]

表 9 8

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 98	$\alpha$ -148番目	G l y	A s p	G G C	G A C
	$\alpha$ -204番目	V a l	A r g	G T C	C G C

[実施例60] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (99)

クローンNo. 77のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの51番目: P h eがV a l) とクローンNo. 20のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの108番目: G l uがA s p) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121°C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100  $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例20で得られたクローンNo. 20を一白金耳植菌し、37°C・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 78記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50  $\mu$ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15秒、アニーリング (55°C) 30秒、伸長反応 (72°C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50  $\mu$ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ lを用いたア

ガロース電気泳動（アガロース濃度 1.0 重量%）により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 99 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 99 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットの 51 番目の Phe が Val に、 $\beta$  サブユニットの 108 番目の Glu が Asp にそれぞれ置換されていた。

[表 99]

表 99

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 99	$\beta$ -51 番目 $\beta$ -108 番目	Phe Glu	Val Asp	TTC GAG	GTC GAT

[参考例 40] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（100）

クローン No. 20 のアミノ酸変異（ $\beta$  サブユニットの 108 番目：Glu が Asp）とクローン No. 30 のアミノ酸変異（ $\beta$  サブユニットの 200 番目：Ala が Glu）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、 $121^{\circ}\text{C} \cdot 20$  分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が  $100 \mu\text{g/ml}$  となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 30 で得られたクローン No. 30 を一白金耳植菌し、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 300 \text{ rpm}$  にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（ $15000 \text{ rpm} \times 5$  分）によ

り菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA 10 ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：29記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$  lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$  lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$  lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 100を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表100に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの108番目のGluがAspに、 $\beta$ サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

[表100]

表100

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 100	$\beta$ -108番目 $\beta$ -200番目	G l u A l a	A s p G l u	G A G G C C	G A T G A C

[実施例61] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (101)

クローンNo. 82のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの118番目: P h e が V a l) とクローンNo. 30のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの200番目: A l a が G l u) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121°C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100  $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例30で得られたクローンNo. 30を一金耳植菌し、37°C・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 83記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50  $\mu$ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15秒、アニーリング (55°C) 30秒、伸長反応 (72°C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50  $\mu$ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR反応No. 1と同様の操作によ

り行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 $\mu$ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 101を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表101に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの118番目のPheがValに、 $\beta$ サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

[表101]

表101

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 101	$\beta$ -118番目 $\beta$ -200番目	Phe Ala	Val Glu	TTC GCC	GTC GAC

[実施例62] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（102）

クローンNo. 88のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの160番目：ArgがTrp）とクローンNo. 92のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの186番目：LeuがArg）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121 $^{\circ}$ C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例53で得られたクローンNo. 92を白金耳植菌し、37 $^{\circ}$ C・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1ml

を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000rpm×5分）により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号：89記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号：8に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μlの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μlの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5μlを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 102を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表102に示したように野生型のニトリルヒドラターゼのβサブユニットの160番目のArgがTrpに、βサブユニットの186番目のLeuがArgにそれぞれ置換されていた。

[表102]

表102

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 102	$\beta$ -160番目 $\beta$ -186番目	Arg Leu	Trp Arg	CGG CTG	TGG CGG

[実施例63] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (103)

クローンNo. 2のアミノ酸変異 ( $\alpha$ サブユニットの6番目: LeuがThr) とクローンNo. 97のアミノ酸変異 ( $\alpha$ サブユニットの36番目: ThrがMet;  $\alpha$ サブユニットの126番目: PheがTyr) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121°C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100  $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例58で得られたクローンNo. 97を一白金耳植菌し、37°C・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 11記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50  $\mu$ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15秒、アニーリング (55°C) 30秒、伸長反応 (72°C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号: 10に配列を記載) を各々50pmol含む全量50  $\mu$ lの系

(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$  lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 103を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表103に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの6番目のLeuがThrに、 $\alpha$ サブユニットの36番目のThrがMetに、 $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表103]

表103

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 103	$\alpha$ -6番目	Leu	Thr	CTG	ACG
	$\alpha$ -36番目	Thr	Met	ACG	ATG
	$\alpha$ -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC

[実施例64] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得(104)

クローンNo. 41のアミノ酸変異( $\alpha$ サブユニットの71番目: ArgがHis)とクローンNo. 32のアミノ酸変異( $\alpha$ サブユニットの19番目: AlaがVal;  $\alpha$ サブユニットの126番目: PheがTyr)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100  $\mu$ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 32 で得られたクローン No. 32 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：42 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ l の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5  $\mu$ l を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 104 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 104 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの  $\alpha$  サブユニットの 19 番目の Ala が Val に、 $\alpha$  サブユニットの 71 番目の Arg が His に、 $\alpha$  サブユニットの 126 番目の Phe が Tyr にそれぞれ置換されていた。

[表104]

表104

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 104	$\alpha$ -19番目 $\alpha$ -71番目 $\alpha$ -126番目	Ala Arg Phe	Val His Tyr	GCG CGT TTC	GTG CAT TAC

[実施例65] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (105)

クローンNo. 40のアミノ酸変異 ( $\alpha$ サブユニットの36番目: ThrがMet) とクローンNo. 98のアミノ酸変異 ( $\alpha$ サブユニットの148番目: GlyがAsp;  $\alpha$ サブユニットの204番目: ValがArg) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121°C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100  $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例59で得られたクローンNo. 98を一白金耳植菌し、37°C・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 41記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50  $\mu$ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15秒、アニーリング (55°C) 30秒、伸長反応 (72°C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー (配列表の配列番号: 9に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配

列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 105を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表105に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの36番目のThrがMetに、 $\alpha$ サブユニットの148番目のGlyがAspに、 $\alpha$ サブユニットの204番目のValがArgにそれぞれ置換されていた。

[表105]

表105

クローン番号	変異箇所 ( $\alpha$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 105	$\alpha$ -36番目	Thr	Met	ACG	ATG
	$\alpha$ -148番目	Gly	Asp	GGC	GAC
	$\alpha$ -204番目	Val	Arg	GTC	CGC

[実施例66] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（106）

クローンNo. 47のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの10番目：ThrがAsp）とクローンNo. 101のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの118番目：PheがVal； $\beta$ サブユニットの200番目：AlaがGlu）を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていること

を確認した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、 $121^{\circ}\text{C}$ ・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が  $100\text{ }\mu\text{g/ml}$  となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 61 で得られたクローン No. 101 を一白金耳植菌し、 $37^{\circ}\text{C}$ ・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 ( $15000\text{ rpm}\times 5\text{分}$ ) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：48 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu\text{l}$  の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 ( $98^{\circ}\text{C}$ ) 15 秒、アニーリング ( $55^{\circ}\text{C}$ ) 30 秒、伸長反応 ( $72^{\circ}\text{C}$ ) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu\text{l}$  の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5  $\mu\text{l}$  を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 106 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 106 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの  $\beta$  サブユニットの 10 番目の Thr が Asp に、 $\beta$  サブユニットの 118 番目の Phe が Val に、 $\beta$  サブユニットの 200 番目の Ala が Glu にそれぞれ置換さ

れていた。

[表106]

表106

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 106	$\beta$ -10番目	Thr	Asp	ACC	GAC
	$\beta$ -118番目	Phe	Val	TTC	GTC
	$\beta$ -200番目	Ala	Glu	GCC	GAC

[実施例67] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (107)

クローンNo. 56のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの37番目: PheがLeu) とクローンNo. 100のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの108番目: GluがAsp;  $\beta$ サブユニットの200番目: AlaがGlu) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121°C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100  $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例40で得られたクローンNo. 100を一白金耳植菌し、37°C・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 57記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50  $\mu$ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15秒、アニーリング (55°C) 30秒、伸長反応 (72°C) 120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プ

ライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 107を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表107に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットの37番目のPheがLeuに、 $\beta$ サブユニットの108番目のGluがAspに、 $\beta$ サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

[表107]

表107

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 107	$\beta$ -37番目	Phe	Leu	TTC	CTC
	$\beta$ -108番目	Glu	Asp	GAG	GAT
	$\beta$ -200番目	Ala	Glu	GCC	GAC

[実施例68] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（108）

クローンNo. 58のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの37番目：PheがVal）とクローンNo. 100のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの108番目：GluがAsp； $\beta$ サブユニットの200番目：AlaがGlu）を共に有して

いるアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 40 で得られたクローン No. 100 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) により菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりプラスミド DNA を調製した。

調製したプラスミド DNA 10 ng を各々鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 No. 1 は、配列表の配列番号：59 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号：8 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu\text{l}$  の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98℃) 15 秒、アニーリング (55℃) 30 秒、伸長反応 (72℃) 120 秒の条件を 25 サイクル繰り返すことにより行った。PCR 反応 No. 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号：9 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号：10 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu\text{l}$  の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 No. 1 と同様の操作により行った。PCR 反応 No. 1 および No. 2 の反応終了液各 5  $\mu\text{l}$  を用いたアガロース電気泳動 (アガロース濃度 1.0 重量%) により DNA 増幅産物の分析を行ったところ、増幅 DNA 産物の存在が確認できた。以後、実施例 1 と全く同じ操作により、形質転換体 No. 108 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100% であった。

また、上記菌体からアルカリ SDS 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 108 に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットの 37 番目の Phe が Val に、 $\beta$  サブユニットの 108 番目の Gl

uがA s pに、 $\beta$ サブユニットの200番目のA l aがG l uにそれぞれ置換されていた。

[表108]

表108

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 108	$\beta$ -37番目	P h e	V a l	T T C	G T C
	$\beta$ -108番目	G l u	A s p	G A G	G A T
	$\beta$ -200番目	A l a	G l u	G C C	G A C

[実施例69] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (109)

クローンNo. 63のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの41番目: P h eがI l e) とクローンNo. 99のアミノ酸変異 ( $\beta$ サブユニットの51番目: P h eがV a l ;  $\beta$ サブユニットの108番目: G l uがA s p) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121°C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例60で得られたクローンNo. 99を一白金耳植菌し、37°C・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000rpm×5分) により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 64記載のプライマー及びM13プライマーM4 (配列表の配列番号: 8に配列を記載) を各々50pmol含む全量50 $\mu$ lの系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15秒、アニーリング (55°C) 30秒、伸長反応 (72°C) 120秒の条件

を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 109を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表109に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットの41番目のPheがIleに、 $\beta$ サブユニットの51番目のPheがValに、 $\beta$ サブユニットの108番目のGluがAspにそれぞれ置換されていた。

[表109]

表109

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 109	$\beta$ -41番目	Phe	Ile	TTC	ATC
	$\beta$ -51番目	Phe	Val	TTC	GTC
	$\beta$ -108番目	Glu	Asp	GAG	GAT

[実施例70] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（110）

クローンNo. 68のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの46番目：MetがLys）とクローンNo. 37のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの108番目：G

1 uがA r g ;  $\beta$  サブユニットの212番目: S e r がT y r ) を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30 m l の試験管に10 m l のL B液体培地を調製し、121°C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100  $\mu$  g / m l となるようにアンピシリンを添加した後、参考例37で得られたクローンNo. 37を一金耳植菌し、37°C・300 r p mにて約20時間培養した。該培養液1 m l を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000 r p m×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリS D S抽出法により該菌体よりプラスミドD N Aを調製した。

調製したプラスミドD N A 10 n g を各々鋳型として2種類のP C R反応を行った。P C R反応No. 1は、配列表の配列番号: 69記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50 p m o l 含む全量50  $\mu$  l の系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98°C)15秒、アニーリング(55°C)30秒、伸長反応(72°C)120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。P C R反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーR V (配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50 p m o l 含む全量50  $\mu$  l の系(組成はキットに記載の条件による)で、P C R反応No. 1と同様の操作により行った。P C R反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$  l を用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりD N A増幅産物の分析を行ったところ、増幅D N A産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 110を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリS D S抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表110に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サ

βサブユニットの46番目のMetがLysに、βサブユニットの108番目のGluがArgに、βサブユニットの212番目のSerがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表110]

表110

クローン番号	変異箇所 (βサブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 110	β-46番目 β-108番目 β-212番目	Met Glu Ser	Lys Arg Tyr	ATG GAG TCC	AAG CGG TAC

[実施例71] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (111)

クローンNo. 72のアミノ酸変異(βサブユニットの48番目: LeuがVal)とクローンNo. 37のアミノ酸変異(βサブユニットの108番目: GluがArg; βサブユニットの212番目: SerがTyr)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例37で得られたクローンNo. 37を白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 73記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μlの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃

）15秒、アニーリング（55℃）30秒、伸長反応（72℃）120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号：9に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号：10に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5  $\mu$ lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 111を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表111に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットの48番目のLeuがValに、 $\beta$ サブユニットの108番目のGluがArgに、 $\beta$ サブユニットの212番目のSerがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表111]

表111

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 111	$\beta$ -48番目	Leu	Val	CTG	GTG
	$\beta$ -108番目	Glu	Arg	GAG	CGG
	$\beta$ -212番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

[実施例72] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（12）

クローンNo. 85のアミノ酸変異（ $\beta$ サブユニットの127番目：Leuが

Ser)と クローンNo. 102のアミノ酸変異( $\beta$ サブユニットの160番目: ArgがTrp;  $\beta$ サブユニットの186番目: LeuがArg)を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、 $121^{\circ}\text{C} \cdot 20$ 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が $100 \mu\text{g/ml}$ となるようにアンピシリンを添加した後、実施例62で得られたクローンNo. 102を一白金耳植菌し、 $37^{\circ}\text{C} \cdot 300 \text{ rpm}$ にて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離( $15000 \text{ rpm} \times 5$ 分)により菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりプラスミドDNAを調製した。

調製したプラスミドDNA10ngを各々鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応No. 1は、配列表の配列番号: 86記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号: 8に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu\text{l}$ の系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性( $98^{\circ}\text{C}$ )15秒、アニーリング( $55^{\circ}\text{C}$ )30秒、伸長反応( $72^{\circ}\text{C}$ )120秒の条件を25サイクル繰り返すことにより行った。PCR反応No. 2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号: 9に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号: 10に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu\text{l}$ の系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応No. 1と同様の操作により行った。PCR反応No. 1およびNo. 2の反応終了液各5 $\mu\text{l}$ を用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、増幅DNA産物の存在が確認できた。以後、実施例1と全く同じ操作により、形質転換体No. 112を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定

した。その結果、表112に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットの127番目のLeuがSerに、 $\beta$ サブユニットの160番目のArgがTrpに、 $\beta$ サブユニットの186番目のLeuがArgにそれぞれ置換されていた。

[表112]

表112

クローン番号	変異箇所 ( $\beta$ サブユニット内)	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 112	$\beta$ -127番目	Leu	Ser	CTG	TCG
	$\beta$ -160番目	Arg	Trp	CGG	TGG
	$\beta$ -186番目	Leu	Arg	CTG	CGG

[実施例73] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (113)

クローンNo. 34のアミノ酸変異とクローンNo. 110のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例34で得られたクローンNo. 34および実施例70で得られたクローンNo. 110を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 34及びクローンNo. 110のプラスミドDNAをそれぞれ調製した。

クローンNo. 110のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプV I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度1.0%)を行い、アガロースゲルから約770bpのDNA断片を切り出した。同様に、クローンNo. 34のプラスミドDNAをE

c o R I および N o t I によって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度 0.7 %）を行い、アガロースゲルから約 3.8 k b p の DNA 断片を切り出した。切りだした両アガロース片（約 0.1 g）を細かく粉碎し 1 m l の T E 溶液にそれぞれ懸濁後、55 °C で 1 時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各 DNA 断片を精製し、最終的に 10  $\mu$  l の T E に溶解した。

この様にして得られたクローン N o. 110 由来の約 770 b p の DNA 断片とクローン N o. 34 由来の約 3.8 K b p の DNA 断片を DNA ライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌 H B 101 のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体 N o. 113 を得た。

次に、参考例 1 と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は 100 % であった。

また、上記菌体からアルカリ S D S 抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、A B I 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表 113 に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの  $\alpha$  サブユニットの 6 番目の L e u が T h r に、 $\alpha$  サブユニットの 19 番目の A l a が V a l に、 $\alpha$  サブユニットの 126 番目の P h e が T y r に、 $\beta$  サブユニットの 46 番目の M e t が L y s に、 $\beta$  サブユニットの 108 番目の G l u が A r g に、 $\beta$  サブユニットの 212 番目の S e r が T y r にそれぞれ置換されていた。

[表 1 1 3]

表 1 1 3

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 113	$\alpha$ -6 番目	Leu	Thr	CTG	ACG
	$\alpha$ -19 番目	Ala	Val	GCG	GTG
	$\alpha$ -126 番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	$\beta$ -46 番目	Met	Lys	ATG	AAG
	$\beta$ -108 番目	Glu	Arg	GAG	CGG
	$\beta$ -212 番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

[実施例 7 4] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (1 1 4)

クローン No. 34 のアミノ酸変異とクローン No. 111 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100  $\mu$ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、参考例 34 で得られたクローン No. 34 および実施例 7 1 で得られたクローン No. 111 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 34 及びクローン No. 111 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

クローン No. 111 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 34 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 0.7%) を行い、アガロースゲルから約 3.8 kbp の DNA 断片を切り出した。切りだした両アガロ

ース片（約0.1g）を細かく粉碎し1mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 $\mu$ lのTEに溶解した。

この様にして得られたクローンNo. 111由来の約770bpのDNA断片とクローンNo. 34由来の約3.8KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 114を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表114に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの6番目のLeuがThrに、 $\alpha$ サブユニットの19番目のAlaがValに、 $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrに、 $\beta$ サブユニットの48番目のLeuがValに、 $\beta$ サブユニットの108番目のGluがArgに、 $\beta$ サブユニットの212番目のSerがTyrにそれぞれ置換されていた。

[表114]

表114

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 114	$\alpha$ -6番目	Leu	Thr	CTG	ACG
	$\alpha$ -19番目	Ala	Val	GCG	GTG
	$\alpha$ -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	$\beta$ -48番目	Leu	Val	CTG	GTG
	$\beta$ -108番目	Glu	Arg	GAG	CGG
	$\beta$ -212番目	Ser	Tyr	TCC	TAC

[実施例75] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（1

15)

クローンNo. 35のアミノ酸変異とクローンNo. 112のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、参考例35で得られたクローンNo. 35および実施例72で得られたクローンNo. 112を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 35及びクローンNo. 112のプラスミドDNAをそれぞれ調製した。

クローンNo. 112のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプV I I低融点アガロース使用;アガロース濃度1.0%)を行い、アガロースゲルから約770bpのDNA断片を切り出した。同様に、クローンNo. 35のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプV I I低融点アガロース使用;アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.8kbpのDNA断片を切り出した。切り出した両アガロース片(約0.1g)を細かく粉碎し1mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 $\mu$ lのTEに溶解した。

この様にして得られたクローンNo. 112由来の約770bpのDNA断片とクローンNo. 35由来の約3.8KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体No. 115を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表115に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの6番目のLeuがAlaに、 $\alpha$ サブユニットの19番目のAlaがValに、 $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrに、 $\beta$ サブユニットの127番目のLeuがSerに、 $\beta$ サブユニットの160番目のArgがTrpに、 $\beta$ サブユニットの186番目のLeuがArgにそれぞれ置換されていた。

[表115]

表115

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 115	$\alpha$ -6番目	Leu	Ala	CTG	GCG
	$\alpha$ -19番目	Ala	Val	GCG	GTG
	$\alpha$ -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	$\beta$ -127番目	Leu	Ser	CTG	TCG
	$\beta$ -160番目	Arg	Trp	CGG	TGG
	$\beta$ -186番目	Leu	Arg	CTG	CGG

[実施例76] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（116）

クローンNo. 103のアミノ酸変異とクローンNo. 106のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例63で得られたクローンNo. 103および実施例66で得られたクローンNo. 106を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000rpm×5分）によりそれぞれの菌体を分離し

た。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 103及びクローンNo. 106のプラスミドDNAをそれぞれ調製した。

クローンNo. 106のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度1.0%）を行い、アガロースゲルから約770bpのDNA断片を切り出した。同様に、クローンNo. 103のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%）を行い、アガロースゲルから約3.8kbpのDNA断片を切り出した。切りだした両アガロース片（約0.1g）を細かく粉砕し1mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 $\mu$ lのTEに溶解した。

この様にして得られたクローンNo. 106由来の約770bpのDNA断片とクローンNo. 103由来の約3.8KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 116を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表116に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの6番目のLeuがThrに、 $\alpha$ サブユニットの36番目のThrがMetに、 $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrに、 $\beta$ サブユニットの10番目のThrがAspに、 $\beta$ サブユニットの118番目のPheがValに、 $\beta$ サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

[表 1 1 6]

表 1 1 6

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 116	$\alpha$ -6 番目	L e u	T h r	C T G	A C G
	$\alpha$ -36 番目	T h r	M e t	A C G	A T G
	$\alpha$ -126 番目	P h e	T y r	T T C	T A C
	$\beta$ -10 番目	T h r	A s p	A C C	G A C
	$\beta$ -118 番目	P h e	V a l	T T C	G T C
	$\beta$ -200 番目	A l a	G l u	G C C	G A C

[実施例 7 7] ニトリルヒドラーゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (117)

クローン No. 104 のアミノ酸変異とクローン No. 107 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100  $\mu$ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 64 で得られたクローン No. 104 および実施例 67 で得られたクローン No. 107 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 104 及びクローン No. 107 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

クローン No. 107 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 104 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 0.7%) を行い、アガロースゲルから約 3.8 kbp の DNA 断片を切り出した。切り出した両アガ

ロース片（約0.1 g）を細かく粉碎し1 mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、5℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10  $\mu$  lのTEに溶解した。

この様にして得られたクローンNo. 107由来の約770 bpのDNA断片とクローンNo. 104由来の約3.8 KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 117を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表117に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの19番目のAlaがValに、 $\alpha$ サブユニットの71番目のArgがHisに、 $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrに、 $\beta$ サブユニットの37番目のPheがLeuに、 $\beta$ サブユニットの108番目のGluがAspに、 $\beta$ サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

[表117]

表117

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 117	$\alpha$ -19番目	Ala	Val	GCG	GTG
	$\alpha$ -71番目	Arg	His	CGT	CAT
	$\alpha$ -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	$\beta$ -37番目	Phe	Leu	TTC	CTC
	$\beta$ -108番目	Glu	Asp	GAG	GAT
	$\beta$ -200番目	Ala	Glu	GCC	GAC

[実施例78] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（1

18)

クローンNo. 104のアミノ酸変異とクローンNo. 108のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラーゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、12.1℃・2.0分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例64で得られたクローンNo. 104および実施例68で得られたクローンNo. 108を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離(15000rpm×5分)によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 104及びクローンNo. 108のプラスミドDNAをそれぞれ調製した。

クローンNo. 108のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプV I I低融点アガロース使用;アガロース濃度1.0%)を行い、アガロースゲルから約770bpのDNA断片を切り出した。同様に、クローンNo. 104のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプV I I低融点アガロース使用;アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約3.8kbpのDNA断片を切り出した。切りだした両アガロース片(約0.1g)を細かく粉碎し1mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 $\mu$ lのTEに溶解した。

この様にして得られたクローンNo. 108由来の約770bpのDNA断片とクローンNo. 104由来の約3.8KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、形質転換体No. 118を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及

び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表118に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの19番目のAlaがValに、 $\alpha$ サブユニットの71番目のArgがHisに、 $\alpha$ サブユニットの126番目のPheがTyrに、 $\beta$ サブユニットの37番目のPheがValに、 $\beta$ サブユニットの108番目のGluがAspに、 $\beta$ サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

[表118]

表118

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 118	$\alpha$ -19番目	Ala	Val	GCG	GTG
	$\alpha$ -71番目	Arg	His	CGT	CAT
	$\alpha$ -126番目	Phe	Tyr	TTC	TAC
	$\beta$ -37番目	Phe	Val	TTC	GTC
	$\beta$ -108番目	Glu	Asp	GAG	GAT
	$\beta$ -200番目	Ala	Glu	GCC	GAC

[実施例79] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得（119）

クローンNo. 105のアミノ酸変異とクローンNo. 109のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30mlの試験管に10mlのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100 $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、実施例65で得られたクローンNo. 105および実施例69で得られたクローンNo. 109を一白金耳植菌し、37℃・300rpmにて約20時間培養した。該培養液1mlを適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離（15000rpm×5分）によりそれぞれの菌体を分離し

た。続いてアルカリSDS抽出法により該菌体よりクローンNo. 105及びクローンNo. 109のプラスミドDNAをそれぞれ調製した。

クローンNo. 109のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度1.0%）を行い、アガロースゲルから約770bpのDNA断片を切り出した。同様に、クローンNo. 105のプラスミドDNAをEcoRIおよびNotIによって切断した後、アガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%）を行い、アガロースゲルから約3.8kbpのDNA断片を切り出した。切り出した両アガロース片（約0.1g）を細かく粉碎し1mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 $\mu$ lのTEに溶解した。

この様にして得られたクローンNo. 109由来の約770bpのDNA断片とクローンNo. 105由来の約3.8KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 119を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラターゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表119に示したように野生型のニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットの36番目のThrがMetに、 $\alpha$ サブユニットの148番目のGlyがAspに、 $\alpha$ サブユニットの204番目のValがArgに、 $\beta$ サブユニットの41番目のPheがIleに、 $\beta$ サブユニットの51番目のPheがValに、 $\beta$ サブユニットの108番目のGluがAspにそれぞれ置換されていた。

[表 119]

表 119

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 119	$\alpha$ -36番目	Thr	Met	ACG	ATG
	$\alpha$ -148番目	Gly	Asp	GGC	GAC
	$\alpha$ -204番目	Val	Arg	GTC	CGC
	$\beta$ -41番目	Phe	Ile	TTC	ATC
	$\beta$ -51番目	Phe	Val	TTC	GTC
	$\beta$ -108番目	Glu	Asp	GAG	GAT

[実施例 80] ニトリルヒドラターゼ活性を保持したアミノ酸置換体の取得 (120)

クローン No. 98 のアミノ酸変異とクローン No. 100 のアミノ酸変異を共に有しているアミノ酸置換体においてもニトリルヒドラターゼ活性が保持されていることを確認した。

30 ml の試験管に 10 ml の LB 液体培地を調製し、121℃・20 分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が 100  $\mu$ g/ml となるようにアンピシリンを添加した後、実施例 59 で得られたクローン No. 98 および参考例 40 で得られたクローン No. 100 を一白金耳植菌し、37℃・300 rpm にて約 20 時間培養した。該培養液 1 ml を適当な遠心チューブに分取した後、遠心分離 (15000 rpm×5 分) によりそれぞれの菌体を分離した。続いてアルカリ SDS 抽出法により該菌体よりクローン No. 98 及びクローン No. 100 のプラスミド DNA をそれぞれ調製した。

クローン No. 100 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 1.0%) を行い、アガロースゲルから約 770 bp の DNA 断片を切り出した。同様に、クローン No. 98 のプラスミド DNA を EcoRI および NotI によって切断した後、アガロースゲル電気泳動 (シグマ社製タイプ V I I 低融点アガロース使用; アガロース濃度 0.7%) を行い、アガロースゲルから約 3.8 kbp の DNA 断片を切り出した。切り出した両アガロ

ース片（約0.1g）を細かく粉碎し1mlのTE溶液にそれぞれ懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って各DNA断片を精製し、最終的に10 $\mu$ lのTEに溶解した。

この様にして得られたクローンNo. 100由来の約770bpのDNA断片とクローンNo. 98由来の約3.8KbpのDNA断片をDNAライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させてプラスミドを構築した。このプラスミドにより大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 120を得た。

次に、参考例1と同じ方法により添加率及び選択率を求めたところ、転化率及び選択率は100%であった。

また、上記菌体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製した。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によってニトリルヒドラーゼ遺伝子部分の塩基配列を決定した。その結果、表120に示したように野生型のニトリルヒドラーゼの $\alpha$ サブユニットの148番目のGlyがAspに、 $\alpha$ サブユニットの204番目のValがArgに、 $\beta$ サブユニットの108番目のGluがAspに、 $\beta$ サブユニットの200番目のAlaがGluにそれぞれ置換されていた。

[表120]

表120

クローン番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		野生型	変異体	野生型	変異体
No. 120	$\alpha$ -148番目	Gly	Asp	GGC	GAC
	$\alpha$ -204番目	Val	Arg	GTC	CGC
	$\beta$ -108番目	Glu	Asp	GAG	GAT
	$\beta$ -200番目	Ala	Glu	GCC	GAC

[実施例81] ロドコッカス ロドクロウス J-1株からのゲノムDNA調製

500mlのバッフル付三角フラスコに下記の組成の培地100mlを調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。

培地組成；

グルコース：10.0 g/L、リン酸二水素一カリウム：0.5 g/L、リン酸一水素二カリウム：0.5 g/L、硫酸マグネシウム・七水和物：0.5 g/L、酵母エキストラクト：1.0 g/L、ペプトン：7.5 g/L、尿素：7.5 g/L、塩化コバルト・六水和物：10.0 mg/L、pH 7.2

この培地に特許文献1記載のロドコッカス・ロドクロウスJ-1株（FERM BP-1478として、前記の寄託機関に特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約に基づいて寄託されており、万人に対し請求により分譲される）を一白菌耳植菌し、30℃・130 rpmにて72時間培養した。遠心分離（15000 G×15分間）により菌体のみを培養液より分離し、続いて、50 mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。

上記で得た湿菌体2 gに0.15 MのNaClを含む50 mMのEDTA・2 Na水溶液（pH 8.0）を40 ml加えて菌体を懸濁し、90℃で10分間煮沸処理した。該処理液を37℃まで冷却した後に、卵白リゾチームを100 mg加えて37℃で1時間保温した。次に20000 U/mgのザイモリレースを30 mg加えて37℃で1時間保温した。続いて20 U/mgのプロテイナーS Kを5 mg加えて37℃で1時間保温した。更に、10% SDS溶液を2 ml添加して65℃で1時間保温した後、直ちにフェノール/クロロホルム抽出を行った。まず、TE（1 mMのEDTA・2 Naを含む10 mMのトリス塩酸水溶液；pH 8.0）で飽和させたフェノール液42 mlを加え緩やかに攪拌した。遠心分離（3000 rpm・10分間）により水相と有機相を分離し、水相のみを分取した。この水相に上記のTE飽和フェノール液21 mlとクロロホルム21 mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離（3000 rpm・10分間）により水相と有機相を再度分離し、水相のみを再分取した。この水相にクロロホルム42 mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離（3000 rpm・10分間）により水相と有機相を再度分離し、水相のみを分取した。この水相に1.1 MのNaClを含むTE溶液4 mlとエタノール92 mlを加えてしばらく室温で放置した後、析出した糸状のDNAをガラス棒を用いて巻取った。70%・

80%・90%のエタノール水溶液で順次脱水を行った後に風乾させた該DNAを40mlのTE溶液に再溶解させた。RNase Aを30 $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、制限酵素BamHIにより部分切断した。フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって部分切断された該DNAを再精製し、最終的に1.0 $\mu$ g/mlとなるようにTE溶液に溶解させた。

【実施例82】PCRを用いたロドコッカス ロドクロウス J-1株ゲノムDNAからのニトリルヒドラターゼ遺伝子の調製

特許文献2及び非特許文献1において明らかになっているニトリルヒドラターゼ遺伝子の塩基配列に基づいて、配列表の配列番号105及び106記載のプライマーを合成した。実施例81にて調製した部分切断された染色体DNA3 $\mu$ gを鋳型としてPCRを行った。PCR反応では、各プライマーを各々200ngとKODポリメラーゼ（東洋紡績社製）を1Uを含む全量50 $\mu$ lの系で、熱変性（98℃）15秒・アニーリング（58℃）15秒・伸長反応（68℃）2分間のサイクルを40回繰り返した。PCR反応の終了液をアガロース電気泳動（シグマ社製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約1.3kbpの増幅DNA産物の存在が確認できた。

続いて、アガロースゲルから約1.3kbpのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片（約0.1g）を細かく粉砕し1mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行った。まず、TE（1mMのEDTA・2Naを含む10mMのトリス塩酸水溶液；pH8.0）で飽和させたフェノール液1mlを加え緩やかに攪拌した。遠心分離（3000rpm・10分間）により水相と有機相を分離し、水相のみを分取した。この操作を3回繰り返した後、得られた水相に上記のTE飽和フェノール液0.4mlとクロロホルム0.4mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離（3000rpm・10分間）により水相と有機相を再度分離し、水相のみを再分取した。この水相にクロロホルム0.8mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離（3000rpm・10分間）により水相と有機相を再度分離し、水相のみを分取した。この水

相に1.1 MのNaClを含むTE溶液80  $\mu$ lとエタノール1.7 mlを加えて-80℃で30分間放置した後、遠心分離（15000 rpm・20分間・4℃）によりDNA断片の沈殿を回収した。該DNA断片を風乾後、最終的に10  $\mu$ lのTEに溶解した。

精製した約1.3 kbpの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びScaIにより切断した後、アガロース電気泳動（シグマ社製タイプVLI低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約1.3 kbpのDNAの存在が確認できた。アガロースゲルからこの約1.3 kbpのDNA断片を切り出し、該アガロース片（約0.1 g）を細かく粉砕し1 mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行った。まず、TE（1 mMのEDTA・2 Naを含む10 mMのトリス塩酸水溶液；pH 8.0）で飽和させたフェノール液1 mlを加え緩やかに攪拌した。遠心分離（3000 rpm・10分間）により水相と有機相を分離し、水相のみを分取した。この操作を3回繰り返した後、得られた水相に上記のTE飽和フェノール液0.4 mlとクロロホルム0.4 mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離（3000 rpm・10分間）により水相と有機相を再度分離し、水相のみを再分取した。この水相にクロロホルム0.8 mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離（3000 rpm・10分間）により水相と有機相を再度分離し、水相のみを分取した。この水相に1.1 MのNaClを含むTE溶液80  $\mu$ lとエタノール1.7 mlを加えて-80℃で30分間放置した後、遠心分離（15000 rpm・20分間・4℃）によりDNA断片の沈殿を回収した。該DNA断片を風乾後、最終的に10  $\mu$ lのTEに溶解した。

〔実施例83〕 ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子を発現させる為のプラスミドベクターの調製

500 mlのバッフル付三角フラスコに下記の組成の40  $\mu$ g/mLの硫酸第二鉄・七水和物及び10  $\mu$ g/mLの塩化コバルト・六水和物を含むLB液体培地を100 ml調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。  
培地組成；

酵母エキストラクト：5.0 g/L、ポリペプトン：10.0 g/L、NaCl  
：5.0 g/L、塩化コバルト・六水和物：10.0 mg/L、硫酸第二鉄・七  
水和物：40.0 mg/L、pH 7.5

この培地に終濃度が100  $\mu$ g/mlとなるようにアンピシリンを添加した後、特許文献3記載のMT10822 (FERM BP-5785)を一白菌耳植菌し、37℃・130 rpmにて16時間培養した。遠心分離(15000 G×15分間)により菌体のみを培養液より分離し、続いて、5.0 mlの生理食塩水に該菌体を再懸濁した後に、再度遠心分離を行って湿菌体を得た。該湿菌体よりアルカリSDS抽出法によりpPT-DB1 (図1)のプラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。

精製したプラスミド1  $\mu$ gを制限酵素EcoRI及びEco47IIIにより切断した後、アガロース電気泳動(シグマ社製タイプV I I低融点アガロース使用；アガロース濃度0.8重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約3.3 kbpと約1.3 kbpのDNAの存在が確認できた。アガロースゲルから約3.3 kbpのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片(約0.1 g)を細かく粉砕し1 mlのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行った。まず、TE(1 mMのEDTA・2 Naを含む10 mMのトリス塩酸水溶液；pH 8.0)で飽和させたフェノール液1 mlを加え緩やかに攪拌した。遠心分離(3000 rpm・10分間)により水相と有機相を分離し、水相のみを分取した。この操作を3回繰り返した後、得られた水相に上記のTE飽和フェノール液0.4 mlとクロロホルム0.4 mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離(3000 rpm・10分間)により水相と有機相を再度分離し、水相のみを再分取した。この水相にクロロホルム0.8 mlを加えて再び緩やかに攪拌した後、遠心分離(3000 rpm・10分間)により水相と有機相を再度分離し、水相のみを分取した。この水相に1.1 MのNaClを含むTE溶液80  $\mu$ lとエタノール1.7 mlを加えて-80℃で30分間放置

した後、遠心分離（15000rpm・20分間・4℃）によりDNA断片の沈殿を回収した。該DNA断片を風乾後、最終的に10μlのTEに溶解した。

〔実施例84〕ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラーゼを活性発現させる為の形質転換体の構築

実施例82にて調製したEcoRI及びScaIにより切断された約1.3kbpのDNA断片と実施例83にて調製したEcoRI及びEco47IIIにより切断された約3.3kbpのDNA断片とを混合し、DNA連結反応に供した。反応産物により大腸菌HB101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、形質転換体No. 200を得た。

500mLのバッフル付三角フラスコに40μg/mLの硫酸第二鉄・七水和物及び10μg/mLの塩化コバルト・六水和物を含む100mLのLB液体培地を調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。この培地に終濃度が100μg/mLとなるようにアンピシリンを添加した後、形質転換体No. 200を一白金耳植菌し、37℃・130rpmにて約20時間培養した。該培養終了液から遠心分離（5000G×15分間）により該形質転換体を分離した。続いて、分離した該形質転換体を50mLの生理食塩水に再懸濁した後、再度遠心分離（5000G×15分間）により該形質転換体を分離した。

分離した該形質転換体0.1gを20mLの50mMリン酸カリウム水溶液（pH7.0）に懸濁し、これに0.5mLのアクリロニトリル又はメタアクリロニトリルを添加して30℃で緩やかに攪拌しながら1時間反応させた。反応終了後、HPLCを用いて反応終了液の分析を行った結果、該液中には、添加したニトリル化合物（アクリロニトリル又はメタアクリロニトリル）に相当するモル量のアミド化合物（アクリルアミド又はメタクリルアミド）のみが存在しており、ニトリル化合物（アクリロニトリル又はメタアクリロニトリル）及び対応する有機酸（アクリル酸又はメタクリル酸）の存在は認められなかった。すなわち、転化率及び選択率は100%であった。

また、分離した該形質転換体からアルカリSDS抽出法によりプラスミドを調製し、RNaseAを30μg加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に

1.  $0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  となるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。その結果、該プラスミドはその配列中に配列表の配列番号103記載のニトリルヒドラターゼ活性化蛋白質をコードするORFと配列表の配列番号104記載のロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFとを含んでいる事が確認された。このプラスミドをpJ1H-DB1 (図2) と名付けた。

〔実施例85〕 改変前のニトリルヒドラターゼからの変異導入標的の抽出 (1)

改変方法の対象として、ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼを例として用いた。請求項56から62に記載された変異導入の標的となるアミノ酸残基を特定する方法を例として用いて、標的の抽出を行った。請求項56、57記載の特定方法におけるアミノ酸配列のアラインメントには、日立ソフト社製のDNASISを用いた。請求項58から62記載の特定方法におけるアミノ酸配列のアラインメントに基づく立体構造のモデリングには、アクセルリス社製のモデラー乃至ホモロジーを用いた。

その結果、何れの方法を用いた場合も、抽出されたアミノ酸残基の中に、該ニトリルヒドラターゼを構成する2種のポリペプチドの1つである $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の48番目のTrpが含まれていた。そこで、変異導入標的として、ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の48番目のTrpを例として用いる事とした。

〔実施例86〕 改変前のニトリルヒドラターゼからの変異導入標的の抽出 (2)

改変方法の対象として、シュードノカルディア サーマフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼを例として用いた。請求項56から62に記載された変異導入の標的となるアミノ酸残基を特定する方法を例として用いて、標的の抽出を行った。請求項56、57記載の特定方法におけるアミノ酸配列のアラインメントには、日立ソフト社製のDNASISを用いた。請求項58から62記載の特定方法におけるアミノ酸配列のアラインメントに基づく立体構造のモデリングには、アクセルリス社製のモデラー乃至ホモロジーを用いた。

その結果、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵

素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域に存在するアミノ酸残基として抽出されたアミノ酸残基の内、該ニトリルヒドラターゼを構成する2種のポリペプチドの1つである $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の36番目のThr、48番目のAsnを、もう1つのポリペプチドある $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の32番目のVal、33番目のAla、37番目のPhe、40番目のThr、41番目のPhe、46番目のMet、48番目のLeu、51番目のPhe、61番目のAla、72番目のTrp、112番目のLys、118番目のPhe、127番目のLeuを、各々変異導入標的的代表例として用いる事とした。

〔実施例87〕 改変前のニトリルヒドラターゼからの変異導入標的の抽出 (3)

改変方法の対象として、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼを例として用いた。請求項56から62に記載された変異導入の標的となるアミノ酸残基を特定する方法を例として用いて、標的の抽出を行った。請求項56、57記載の特定方法におけるアミノ酸配列のアラインメントには、日立ソフト社製のDNASISを用いた。請求項58から62記載の特定方法におけるアミノ酸配列のアラインメントに基づく立体構造のモデリングには、アクセルリス社製のモデラー乃至ホモロジーを用いた。

その結果、2量体形成に関与する $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニット間の会合界面や2量体同士の会合に関与する界面を形成する領域に存在するアミノ酸残基として抽出されたアミノ酸残基の内、該ニトリルヒドラターゼを構成する2種のポリペプチドの1つである $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の36番目のThr、148番目のGly、188番目のThr、204番目のValを、もう1つのポリペプチドある $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の10番目のThr、32番目のVal、33番目のAla、112番目のLys、118番目のPhe、127番目のLeu、146番目のArg、150番目のAla、160番目のArg、168番目のThr、171番目のLys、176番目のTyr、186番目のLeu、217番目のAsp、218番目のCysを、各々変異導入標的的代表例として用いる事とした。

〔実施例88〕 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (1)

ニトリルヒドラターゼを構成するポリペプチドのアミノ酸配列に変異を導入する為に、宝酒造社製の「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を用いた部位特異的な変異導入を行った。以後、「LA PCR in vitro mutagenesis Kit」を単にキットと呼ぶ。以下の実施例では、基本的にキットの原理及び操作方法に従った。

実施例84にて構築したロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプラスミド：pJ1H-DB1に、実施例85にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の48番目のTrpを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ngのpJ1H-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号110記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号107に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒・アニーリング（55℃）30秒・伸長反応（72℃）2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号108に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号109に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応1と同様の操作により行った。

PCR反応1及び2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動（アガロース濃度1.0重量%）によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、何れも増幅DNA産物の存在が確認できた。Microcon100（宝酒造社製）を用いてそれぞれのPCR反応終了液より過剰なプライマー及びdNTPを除去した後、TEを加えて各々50  $\mu$ Lの溶液を調製した。該TE溶液を各0.5  $\mu$ Lずつ含む全量47.5  $\mu$ Lのアニーリング溶液（組成はキットに記載の条件による）を調製し、熱変性処理（98℃）を10分間行った後、37℃まで60分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて37℃で15分間保持することによってアニーリング処理を行った。

アニーリング処理液にTaKaRa LA Taqを0.5  $\mu$ L加えて72℃で3分間加熱処理を行い、ヘテロ2本鎖を完成させた。これにM13プライマーM

4 (配列表の配列番号107に配列を記載) 及びM13プライマーRV (配列表の配列番号109に配列を記載) を各々50 pmol加えて全量を50  $\mu$ Lとした後、熱変性(98 $^{\circ}$ C) 15秒・アニーリング(55 $^{\circ}$ C) 30秒・伸長反応(72 $^{\circ}$ C) 2分間の条件を25サイクル繰り返すことによるPCR反応3を行った。

PCR反応3の反応終了液5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動(シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用; アガロース濃度0.8重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約1.9 kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約1.9 kbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 mLのTE溶液に懸濁後、55 $^{\circ}$ Cで1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10  $\mu$ LのTEに溶解した。

精製した約1.9 kbの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びHindIIIにより切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10  $\mu$ LのTEに溶解した。同様に、EcoRI及びHindIIIによりpJ1H-DB1を切断し、アガロースゲル電気泳動(シグマ社製タイプVII低融点アガロース使用; アガロース濃度0.7%)を行い、アガロースゲルから約2.7 kbのDNA断片のみを切り出した。切り出したアガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 mLのTE溶液に懸濁後、55 $^{\circ}$ Cで1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10  $\mu$ LのTEに溶解した。

この様にして得られた約1.9 kbと約2.7 kbのDNA断片をDNA連結反応に供した後、大腸菌HB101のコンピテントセル(東洋紡績社製)を形質転換し、複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈澱によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ LとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によつ

て塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pJ1H-DB1と比較して、ロドコッカス ロドクロウス J-1株由来のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の48番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がTrp以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表121)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表121]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 201	$\beta$ -48番目	Trp	Tyr	tgg	tat
No. 202	$\beta$ -48番目	Trp	Val	tgg	gtg
No. 203	$\beta$ -48番目	Trp	Ala	tgg	gcg
No. 204	$\beta$ -48番目	Trp	Gly	tgg	ggg

#### [実施例89] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(2)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプラスミド：pPT-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の36番目のThrを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号111記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒・アニーリング(55℃)30秒・伸長反応(72℃)2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号108に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号109に配

列を記載)を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応1と同様の操作により行った。

PCR反応1及び2の反応終了液各5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動(アガロース濃度1.0重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、何れも増幅DNA産物の存在が確認できた。Microcon100(宝酒造社製)を用いてそれぞれのPCR反応終了液より過剰なプライマー及びdNTPを除去した後、TEを加えて各々50  $\mu$ Lの溶液を調製した。該TE溶液を各0.5  $\mu$ Lずつ含む全量47.5  $\mu$ Lのアニーリング溶液(組成はキットに記載の条件による)を調製し、熱変性処理(98℃)を10分間行った後、37℃まで60分間かけて一定の速度で冷却を行い、続いて37℃で15分間保持することによってアニーリング処理を行った。

アニーリング処理液にTaKaRa LA Taqを0.5  $\mu$ L加えて72℃で3分間加熱処理を行い、ヘテロ2本鎖を完成させた。これにM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号109に配列を記載)を各々50 pmol加えて全量を50  $\mu$ Lとした後、熱変性(98℃)15秒・アニーリング(55℃)30秒・伸長反応(72℃)2分間の条件を25サイクル繰り返すことによるPCR反応3を行った。

PCR反応3の反応終了液5  $\mu$ Lを用いたアガロース電気泳動(シグマ社製タイプV11低融点アガロース使用;アガロース濃度0.8重量%)によりDNA増幅産物の分析を行ったところ、約1.9 kbの増幅DNA産物の存在が確認できた。続いて、アガロースゲルから約1.9 kbのDNA断片のみを切り出し、該アガロース片(約0.1 g)を細かく粉碎し1 mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10  $\mu$ LのTEに溶解した。

精製した約1.9 kbの増幅DNA断片を制限酵素EcoRI及びHindIIIにより切断した後、この制限酵素処理液に対してフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10  $\mu$ LのTEに溶解した。同様に、EcoRI及びHindIIIによりpPT-DB1を切断し、ア

ガロースゲル電気泳動（シグマ社製タイプV I I 低融点アガロース使用；アガロース濃度0.7%）を行い、アガロースゲルから約2.7 kbのDNA断片のみを切り出した。切り出したアガロース片（約0.1 g）を細かく粉碎し1 mLのTE溶液に懸濁後、55℃で1時間保温してアガロースを完全に融解させた。この融解液に対してフェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行って該DNA断片を精製し、最終的に10  $\mu$ LのTEに溶解した。

この様にして得られた約1.9 kbと約2.7 kbのDNA断片をDNA連結反応に供した後、大腸菌HB 101のコンピテントセル（東洋紡績社製）を形質転換し、複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈澱によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼの $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の36番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がThr以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の（表122）に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表122]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 40	$\alpha$ -36番目	Thr	Met	acg	atg
No. 40a	$\alpha$ -36番目	Thr	Ser	acg	tcg
No. 40b	$\alpha$ -36番目	Thr	Ala	acg	gcg
No. 40c	$\alpha$ -36番目	Thr	Gly	acg	ggg
No. 40d	$\alpha$ -36番目	Thr	Trp	acg	tgg

[実施例 90] 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (3)

実施例 83 にて MT10822 より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラーゼをコードする ORF を含むプラスミド: pPT-DB1 に、実施例 86 又は 87 にて抽出した変異導入標的である  $\alpha$  サブユニットのアミノ酸配列中の 48 番目の Asn を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ng の pPT-DB1 を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 1 は、配列表の配列番号 112 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号 107 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒・アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒・伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 2 分間の条件を 25 サイクル繰り返す事により行った。PCR 反応 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号 108 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号 109 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 89 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase A を 30  $\mu$ g 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように TE 溶液に溶解させた。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1 と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラーゼの  $\alpha$  サブユニットのアミノ酸配列中の 48 番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列が Asn 以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の (表 123) に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表 1 2 3]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 40 e	$\alpha$ -48番目	A s n	G l n	a a c	c a a
No. 40 f	$\alpha$ -48番目	A s n	G l u	a a c	g a a

## [実施例 9 1] 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (4)

実施例 8 3 にて MT 1 0 8 2 2 より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM 3 0 9 5 由来のニトリルヒドラーゼをコードする ORF を含むプラスミド: p P T-DB 1 に、実施例 8 6 又は 8 7 にて抽出した変異導入標的である  $\alpha$  サブユニットのアミノ酸配列中の 7 1 番目の A r g を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

1 0 n g の p P T-DB 1 を鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 1 は、配列表の配列番号 1 1 3 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 1 0 7 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8  $^{\circ}$  C) 1 5 秒・アニーリング (5 5  $^{\circ}$  C) 3 0 秒・伸長反応 (7 2  $^{\circ}$  C) 2 分間の条件を 2 5 サイクル繰り返す事により行った。P C R 反応 2 は、MUT 4 プライマー (配列表の配列番号 1 0 8 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 1 0 9 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 8 9 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、R N a s e A を 3 0  $\mu$  g 加えて 3 7  $^{\circ}$  C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1 . 0  $\mu$  g /  $\mu$  l となるように T E 溶液に溶解させた。続いて、A B I 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、p P T-DB 1 と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM 3 0 9 5 由来のニトリルヒド

ラターゼの $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の71番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がArg以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表124)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表124]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 41	$\alpha$ -71番目	Arg	His	cgt	cat

[実施例92] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(5)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプラスミド：pPT-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の148番目のGlyを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号114記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒・アニーリング(55℃)30秒・伸長反応(72℃)2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号108に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号109に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNaseAを30 $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該

DNAを精製し、最終的に $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pP T-DB 1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼの $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の148番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がGly以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表125)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表125]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 42	$\alpha$ -148番目	Gly	Asp	ggc	gac

#### [実施例93] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(6)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼをコードするORFを含むプラスミド：pP T-DB 1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の188番目のThrを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10ngのpP T-DB 1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号115記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu\text{L}$ の系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒・アニーリング(55℃)30秒・伸長反応(72℃)2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号108に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号109に配

列を記載)を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pP T-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼの $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の188番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がThr以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表126)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表126]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 42a	$\alpha$ -188番目	Thr	Gly	acc	ggc

#### [実施例94] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(7)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼをコードするORFを含むプラスミド: pP T-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の204番目のValを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ngのpP T-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号116記載のプライマー及びM13プライマーM4

(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒・アニーリング(55℃)30秒・伸長反応(72℃)2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号108に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号109に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼの $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列中の204番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がVal以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表127)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表127]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 43	$\alpha$ -204番目	Val	Arg	gtc	cgc
No. 44	$\alpha$ -204番目	Val	Lys	gtc	aaa
No. 45	$\alpha$ -204番目	Val	Trp	gtc	tgg
No. 46	$\alpha$ -204番目	Val	Thr	gtc	acc

[実施例95] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(8)

実施例 83 にて MT10822 より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラーゼをコードする ORF を含むプラスミド: pP T-DB1 に、実施例 86 又は 87 にて抽出した変異導入標的である  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 10 番目の Thr を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ng の pP T-DB1 を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 1 は、配列表の配列番号 117 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号 107 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒・アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒・伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 2 分間の条件を 25 サイクル繰り返す事により行った。PCR 反応 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号 108 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号 109 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 89 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase A を 30  $\mu$ g 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように TE 溶液に溶解させた。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pP T-DB1 と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 10 番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列が Thr 以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の (表 128) に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表 1 2 8]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 47	$\beta$ -10 番目	T h r	A s p	a c c	g a c
No. 48	$\beta$ -10 番目	T h r	G l u	a c c	g a a
No. 49	$\beta$ -10 番目	T h r	T r p	a c c	t g g
No. 50	$\beta$ -10 番目	T h r	G l y	a c c	g g c
No. 51	$\beta$ -10 番目	T h r	T y r	a c c	t a c
No. 52	$\beta$ -10 番目	T h r	C y s	a c c	t g c

## [実施例 9 6] 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (9)

実施例 8 3 にて MT 1 0 8 2 2 より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM 3 0 9 5 由来のニトリルヒドラーゼをコードする ORF を含むプラスミド: pPT-DB1 に、実施例 8 6 又は 8 7 にて抽出した変異導入標的である  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 3 2 番目の V a l を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

1 0 n g の pPT-DB1 を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 1 は、配列表の配列番号 1 1 8 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号 1 0 7 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8  $^{\circ}$ C) 1 5 秒・アニリング (5 5  $^{\circ}$ C) 3 0 秒・伸長反応 (7 2  $^{\circ}$ C) 2 分間の条件を 2 5 サイクル繰り返す事により行った。PCR 反応 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号 1 0 8 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号 1 0 9 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 8 9 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase A を 3 0  $\mu$  g 加えて 3 7  $^{\circ}$ C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1 . 0  $\mu$  g /  $\mu$  l となるように TE 溶液に溶解させた

。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pP T-DB 1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の32番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がV a l以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表129)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表129]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 53	$\beta$ -32番目	V a l	G l y	g t c	g g c

#### [実施例97] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(10)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼをコードするORFを含むプラスミド：pP T-DB 1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の33番目のA l aを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10ngのpP T-DB 1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号119記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒・アニーリング(55℃)30秒・伸長反応(72℃)2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号108に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号109に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条

件による)で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の33番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がAla以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表130)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表130]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 53a	$\beta$ -33番目	Ala	Val	g c g	g t g
No. 53b	$\beta$ -33番目	Ala	Met	g c g	a t g

#### [実施例98] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(11)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプラスミド：pPT-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の37番目のPheを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号120記載のプライマー及びM13プライマーM4

(配列表の配列番号 107 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒・アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒・伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 2 分間の条件を 25 サイクル繰り返す事により行った。PCR 反応 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号 108 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号 109 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 89 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase A を 30  $\mu$ g 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように TE 溶液に溶解させた。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373A を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1 と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラーターゼの  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 37 番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列が Phe 以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の (表 131) に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表 131]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 54	$\beta$ -37 番目	Phe	Thr	ttc	acc
No. 55	$\beta$ -37 番目	Phe	Ala	ttc	gcc
No. 56	$\beta$ -37 番目	Phe	Leu	ttc	ctc
No. 57	$\beta$ -37 番目	Phe	Ile	ttc	atc
No. 58	$\beta$ -37 番目	Phe	Val	ttc	gtc

## [実施例 99] 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (12)

実施例 83 にて MT10822 より調製した シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来の ニトリルヒドラーゼ をコードする ORF を含む プラスミド: pPT-DB1 に、実施例 86 又は 87 にて抽出した変異導入標的である  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 40 番目の Thr を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ng の pPT-DB1 を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 1 は、配列表の配列番号 121 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号 107 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒・アニリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒・伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 2 分間の条件を 25 サイクル繰り返す事により行った。PCR 反応 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号 108 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号 109 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 89 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase A を 30  $\mu$ g 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように TE 溶液に溶解させた。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1 と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 40 番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列が Thr 以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の (表 132) に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表 1 3 2]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 58 a	$\beta$ -40 番目	T h r	V a l	a c g	g t g
No. 58 b	$\beta$ -40 番目	T h r	L e u	a c g	c t g
No. 58 c	$\beta$ -40 番目	T h r	I l e	a c g	a t t

## [実施例 1 0 0] 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (1 3)

実施例 8 3 にて M T 1 0 8 2 2 より調製したシュードノカルディア サーモフィラ J C M 3 0 9 5 由来のニトリルヒドラターゼをコードする O R F を含むプラスミド: p P T - D B 1 に、実施例 8 6 又は 8 7 にて抽出した変異導入標的である  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 4 1 番目の P h e を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

1 0 n g の p P T - D B 1 を鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 1 は、配列表の配列番号 1 2 2 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 1 0 7 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8  $^{\circ}$  C) 1 5 秒・アニーリング (5 5  $^{\circ}$  C) 3 0 秒・伸長反応 (7 2  $^{\circ}$  C) 2 分間の条件を 2 5 サイクル繰り返す事により行った。P C R 反応 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 1 0 8 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 1 0 9 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 8 9 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、R N a s e A を 3 0  $\mu$  g 加えて 3 7  $^{\circ}$  C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1 . 0  $\mu$  g /  $\mu$  l となるように T E 溶液に溶解させた。続いて、A B I 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pP T-D B 1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ J C M 3 0 9 5由来のニトリルヒドラーターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の41番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がP h e以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表133)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表133]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 59	$\beta$ -41番目	P h e	G l u	t t c	g a a
No. 60	$\beta$ -41番目	P h e	T h r	t t c	a c c
No. 61	$\beta$ -41番目	P h e	A l a	t t c	g c c
No. 62	$\beta$ -41番目	P h e	L e u	t t c	c t c
No. 63	$\beta$ -41番目	P h e	I l e	t t c	a t c
No. 64	$\beta$ -41番目	P h e	V a l	t t c	g t c

[実施例101] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(14)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ J C M 3 0 9 5由来のニトリルヒドラーターゼをコードするORFを含むプラスミド：pP T-D B 1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の46番目のM e tを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10ngのpP T-D B 1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号123記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒・アニーリング(55℃)30秒・伸長反応(72℃)2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号

108に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号109に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の46番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がMet以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表134)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表134]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 65	$\beta$ -46番目	Met	Gly	atg	ggg
No. 66	$\beta$ -46番目	Met	Tyr	atg	tat
No. 67	$\beta$ -46番目	Met	Leu	atg	ctg
No. 68	$\beta$ -46番目	Met	Lys	atg	aag
No. 69	$\beta$ -46番目	Met	Asp	atg	gat

[実施例102] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(15)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼをコードするORFを含むプラスミド: pPT-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的の

ある $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の48番目のLeuを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号124記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号107に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒・アニリング（55℃）30秒・伸長反応（72℃）2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号108に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号109に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の48番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がLeu以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の（表135）に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表 1 3 5]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 70	$\beta$ -48番目	Leu	Gly	ctg	ggg
No. 71	$\beta$ -48番目	Leu	Ala	ctg	gcg
No. 72	$\beta$ -48番目	Leu	Val	ctg	gtg
No. 73	$\beta$ -48番目	Leu	Ser	ctg	tcg
No. 74	$\beta$ -48番目	Leu	Thr	ctg	acg
No. 75	$\beta$ -48番目	Leu	Arg	ctg	cgg

[実施例 103] 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (16)

実施例 83 にて MT10822 より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラターゼをコードする ORF を含むプラスミド: pPT-DB1 に、実施例 86 又は 87 にて抽出した変異導入標的である  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 51 番目の Phe を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ng の pPT-DB1 を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 1 は、配列表の配列番号 125 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号 107 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒・アニリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒・伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 2 分間の条件を 25 サイクル繰り返す事により行った。PCR 反応 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号 108 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号 109 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 89 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase A を 30  $\mu$ g 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように TE 溶液に溶解させた

。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pP T-DB 1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼのβサブユニットのアミノ酸配列中の51番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がP h e以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表136)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表136]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 76	β-51番目	P h e	A l a	t t c	g c c
No. 77	β-51番目	P h e	V a l	t t c	g t c

#### [実施例104] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(17)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼをコードするORFを含むプラスミド：pP T-DB 1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的であるβサブユニットのアミノ酸配列中の61番目のA l aを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10ngのpP T-DB 1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号126記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50pmol含む全量50μLの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒・アニーリング(55℃)30秒・伸長反応(72℃)2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号108に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号109に配

列を記載)を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の61番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がAla以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表137)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表137]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 77a	$\beta$ -61番目	Ala	Val	gcc	gtc
No. 77b	$\beta$ -61番目	Ala	Leu	gcc	ctc
No. 77c	$\beta$ -61番目	Ala	Gly	gcc	ggc
No. 77d	$\beta$ -61番目	Ala	Ser	gcc	tcg
No. 77e	$\beta$ -61番目	Ala	Thr	gcc	acg
No. 77f	$\beta$ -61番目	Ala	Trp	gcc	tgg

[実施例105] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(18)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼをコードするORFを含むプラスミド：pPT-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的で

ある $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の72番目のTrpを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号127記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号107に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒・アニーリング（55℃）30秒・伸長反応（72℃）2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号108に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号109に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の72番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がTrp以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の（表138）に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表138]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 78	$\beta$ -72番目	Trp	Phe	tgg	ttt

## [実施例106] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(19)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプラスミド：pPT-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の112番目のLysを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号128記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号107に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98 $^{\circ}$ C）15秒・アニーリング（55 $^{\circ}$ C）30秒・伸長反応（72 $^{\circ}$ C）2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号108に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号109に配列を記載）を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNaseAを30 $\mu$ g加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0 $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒド

ラターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の112番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がLys以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表139)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表139]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 78a	$\beta$ -112番目	Lys	Val	aag	gtg
No. 78b	$\beta$ -112番目	Lys	Ile	aag	att

#### [実施例107] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(20)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプラスミド：pPT-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の118番目のPheを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号129記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98 $^{\circ}$ C)15秒・アニーリング(55 $^{\circ}$ C)30秒・伸長反応(72 $^{\circ}$ C)2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号108に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号109に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNaseAを30 $\mu$ g加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間

保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pP T-DB 1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の118番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がPhe以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表140)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表140]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 79	$\beta$ -118番目	P h e	A l a	t t c	g c c
No. 80	$\beta$ -118番目	P h e	L e u	t t c	c t c
No. 81	$\beta$ -118番目	P h e	I l e	t t c	a t c
No. 82	$\beta$ -118番目	P h e	V a l	t t c	g t c

[実施例108] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(21)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプラスミド：pP T-DB 1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の127番目のL e uを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ngのpP T-DB 1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号130記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50  $\mu\text{L}$ の系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒・アニー

リング（55℃）30秒・伸長反応（72℃）2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号108に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号109に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の127番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がLeu以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の（表141）に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

〔表141〕

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 83	$\beta$ -127番目	Leu	Ala	ctg	gcg
No. 84	$\beta$ -127番目	Leu	Val	ctg	gtg
No. 85	$\beta$ -127番目	Leu	Ser	ctg	tcg

〔実施例109〕 改変酵素獲得を目的とした変異導入（22）

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプ

ラスミド：pP T-DB 1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の146番目のA r gを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ngのpP T-DB 1を鋳型として2種類のP C R反応を行った。P C R反応1は、配列表の配列番号131記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号107に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$  Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒・アニーリング（55℃）30秒・伸長反応（72℃）2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。P C R反応2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号108に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号109に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$  Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、P C R反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$  g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$  g/ $\mu$  lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pP T-DB 1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の146番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がA r g以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の（表142）に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表 1 4 2]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 86	$\beta$ -146番目	A r g	G l y	c g g	g g g

## [実施例 1 1 0] 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (2 3)

実施例 8 3 にて MT 1 0 8 2 2 より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM 3 0 9 5 由来のニトリルヒドラーゼをコードする ORF を含むプラスミド: p P T - D B 1 に、実施例 8 6 又は 8 7 にて抽出した変異導入標的である  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 1 5 0 番目の A l a を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

1 0 n g の p P T - D B 1 を鋳型として 2 種類の P C R 反応を行った。P C R 反応 1 は、配列表の配列番号 1 3 2 記載のプライマー及び M 1 3 プライマー M 4 (配列表の配列番号 1 0 7 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (9 8  $^{\circ}$  C) 1 5 秒・アニーリング (5 5  $^{\circ}$  C) 3 0 秒・伸長反応 (7 2  $^{\circ}$  C) 2 分間の条件を 2 5 サイクル繰り返す事により行った。P C R 反応 2 は、M U T 4 プライマー (配列表の配列番号 1 0 8 に配列を記載) 及び M 1 3 プライマー R V (配列表の配列番号 1 0 9 に配列を記載) を各々 5 0 p m o l 含む全量 5 0  $\mu$  L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、P C R 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 8 9 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、R N a s e A を 3 0  $\mu$  g 加えて 3 7  $^{\circ}$  C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1 . 0  $\mu$  g /  $\mu$  l となるように T E 溶液に溶解させた。続いて、A B I 社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー 3 7 3 A を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、p P T - D B 1 と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM 3 0 9 5 由来のニトリルヒド

ラターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の150番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がA1a以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表143)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表143]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 86a	$\beta$ -150番目	A1a	Ser	g c g	t c g
No. 86b	$\beta$ -150番目	A1a	Asn	g c g	a a t

[実施例111] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(24)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプラスミド: pPT-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の160番目のArgを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号133記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98 $^{\circ}$ C)15秒・アニーリング(55 $^{\circ}$ C)30秒・伸長反応(72 $^{\circ}$ C)2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー(配列表の配列番号108に配列を記載)及びM13プライマーRV(配列表の配列番号109に配列を記載)を各々50pmol含む全量50 $\mu$ Lの系(組成はキットに記載の条件による)で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNaseAを30 $\mu$ g加えて37 $^{\circ}$ Cで1時間

保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に $1.0 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pP T-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の160番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がArg以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の(表144)に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表144]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 87	$\beta$ -160番目	Arg	Leu	c g g	c t g
No. 88	$\beta$ -160番目	Arg	Trp	c g g	t g g
No. 88 a	$\beta$ -160番目	Arg	Met	c g g	a t g
No. 88 b	$\beta$ -160番目	Arg	Cys	c g g	t g t

#### [実施例112] 改変酵素獲得を目的とした変異導入(25)

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼをコードするORFを含むプラスミド：pP T-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の168番目のThrを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ngのpP T-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号134記載のプライマー及びM13プライマーM4(配列表の配列番号107に配列を記載)を各々50 pmol含む全量50  $\mu\text{L}$ の系(組成はキットに記載の条件による)で、熱変性(98℃)15秒・アニー

リング（55℃）30秒・伸長反応（72℃）2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号108に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号109に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシークエンシングキットとオートシークエンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の168番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がThr以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の（表145）に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

〔表145〕

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 88c	$\beta$ -168番目	Thr	acg	Glu	gag

〔実施例113〕 改変酵素獲得を目的とした変異導入（26）

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼをコードするORFを含むプラスミド：pPT-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的である $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の171番目のLysを他のアミノ酸に変

換する為の変異導入を施した。

10 ng の p P T - D B 1 を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR 反応1は、配列表の配列番号135記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号107に配列を記載）を各々50 pmol 含む全量50  $\mu$  L の系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒・アニーリング（55℃）30秒・伸長反応（72℃）2分間の条件を25サイクル繰り返す事により行った。PCR 反応2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号108に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号109に配列を記載）を各々50 pmol 含む全量50  $\mu$  L の系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR 反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase A を30  $\mu$  g 加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$  g /  $\mu$  l となるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、p P T - D B 1 と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の171番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がLys 以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の（表146）に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表146]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 88d	$\beta$ -171番目	Lys	aag	Ala	gcg

## [実施例 114] 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (27)

実施例 83 にて MT10822 より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラーゼをコードする ORF を含むプラスミド: pPT-DB1 に、実施例 86 又は 87 にて抽出した変異導入標的である  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 176 番目の Tyr を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ng の pPT-DB1 を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 1 は、配列表の配列番号 136 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号 107 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98°C) 15 秒・アニーリング (55°C) 30 秒・伸長反応 (72°C) 2 分間の条件を 25 サイクル繰り返す事により行った。PCR 反応 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号 108 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号 109 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 89 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase A を 30  $\mu$ g 加えて 37°C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように TE 溶液に溶解させた。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1 と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来のニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 176 番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列が Tyr 以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の (表 147) に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表 1 4 7]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 88 e	$\beta$ -176番目	Tyr	Ala	tac	gcc
No. 88 f	$\beta$ -176番目	Tyr	Met	tac	atg
No. 88 g	$\beta$ -176番目	Tyr	Cys	tac	tcg
No. 88 h	$\beta$ -176番目	Tyr	Thr	tac	acc

## [実施例 1 1 5] 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (28)

実施例 8 3 にて MT 1 0 8 2 2 より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM 3 0 9 5 由来のニトリルヒドラターゼをコードする ORF を含むプラスミド: pPT-DB 1 に、実施例 8 6 又は 8 7 にて抽出した変異導入標的である  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 186 番目の Leu を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ng の pPT-DB 1 を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 1 は、配列表の配列番号 137 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号 107 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒・アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒・伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 2 分間の条件を 25 サイクル繰り返す事により行った。PCR 反応 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号 108 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号 109 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 8 9 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase A を 30  $\mu$ g 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように TE 溶液に溶解させた。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼのβサブユニットのアミノ酸配列中の186番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がLeu以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の（表148）に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表148]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 89	β-186番目	Leu	Glu	ctg	gag
No. 90	β-186番目	Leu	Asp	ctg	gat
No. 91	β-186番目	Leu	Lys	ctg	aag
No. 92	β-186番目	Leu	Arg	ctg	cgg
No. 93	β-186番目	Leu	Asn	ctg	aac
No. 94	β-186番目	Leu	Ser	ctg	tcg
No. 95	β-186番目	Leu	Gly	ctg	ggg

#### [実施例116] 改変酵素獲得を目的とした変異導入（29）

実施例83にてMT10822より調製したシュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラターゼをコードするORFを含むプラスミド：pPT-DB1に、実施例86又は87にて抽出した変異導入標的であるβサブユニットのアミノ酸配列中の217番目のAspを他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10ngのpPT-DB1を鋳型として2種類のPCR反応を行った。PCR反応1は、配列表の配列番号138記載のプライマー及びM13プライマーM4（配列表の配列番号107に配列を記載）を各々50pmol含む全量50μLの系（組成はキットに記載の条件による）で、熱変性（98℃）15秒・アニーリング（55℃）30秒・伸長反応（72℃）2分間の条件を25サイクル繰り返し

返す事により行った。PCR反応2は、MUT4プライマー（配列表の配列番号108に配列を記載）及びM13プライマーRV（配列表の配列番号109に配列を記載）を各々50 pmol含む全量50  $\mu$ Lの系（組成はキットに記載の条件による）で、PCR反応1と同様の操作により行った。

以後、実施例89と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase Aを30  $\mu$ g加えて37℃で1時間保温した後、フェノール抽出／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該DNAを精製し、最終的に1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lとなるようにTE溶液に溶解させた。続いて、ABI社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー373Aを用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095由来のニトリルヒドラーターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列中の217番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列がAsp以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の（表149）に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

〔表149〕

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 96	$\beta$ -217番目	Asp	Gly	gac	ggc
No. 96a	$\beta$ -217番目	Asp	Val	gac	gtc
No. 96b	$\beta$ -217番目	Asp	Leu	gac	ctc
No. 96c	$\beta$ -217番目	Asp	Met	gac	atg
No. 96d	$\beta$ -217番目	Asp	Cys	gac	tgt
No. 96e	$\beta$ -217番目	Asp	Ser	gac	agc
No. 96f	$\beta$ -217番目	Asp	Thr	gac	acc
No. 96g	$\beta$ -217番目	Asp	His	gac	cac

## [実施例 117] 改変酵素獲得を目的とした変異導入 (30)

実施例 83 にて MT10822 より調製した シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来の ニトリルヒドラーゼ をコードする ORF を含む プラスミド: pPT-DB1 に、実施例 86 又は 87 にて抽出した変異導入標的である  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 218 番目の Cys を他のアミノ酸に変換する為の変異導入を施した。

10 ng の pPT-DB1 を鋳型として 2 種類の PCR 反応を行った。PCR 反応 1 は、配列表の配列番号 139 記載のプライマー及び M13 プライマー M4 (配列表の配列番号 107 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、熱変性 (98 $^{\circ}$ C) 15 秒・アニーリング (55 $^{\circ}$ C) 30 秒・伸長反応 (72 $^{\circ}$ C) 2 分間の条件を 25 サイクル繰り返す事により行った。PCR 反応 2 は、MUT4 プライマー (配列表の配列番号 108 に配列を記載) 及び M13 プライマー RV (配列表の配列番号 109 に配列を記載) を各々 50 pmol 含む全量 50  $\mu$ L の系 (組成はキットに記載の条件による) で、PCR 反応 1 と同様の操作により行った。

以後、実施例 89 と同様な操作を行って複数の形質転換体を得た。該形質転換体から各々プラスミドを調製し、RNase A を 30  $\mu$ g 加えて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した後、フェノール抽出/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって該 DNA を精製し、最終的に 1.0  $\mu$ g/ $\mu$ l となるように TE 溶液に溶解させた。続いて、ABI 社製のシーケンシングキットとオートシーケンサー 373 A を用いたダイデオキシ法によって塩基配列を決定した。

その結果、得られた形質転換体の有するプラスミドは、pPT-DB1 と比較して、シュードノカルディア サーモフィラ JCM3095 由来の ニトリルヒドラーゼ の  $\beta$  サブユニットのアミノ酸配列中の 218 番目のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列が Cys 以外のアミノ酸をコードするコドンに相当する塩基配列に変化したものである事が判明した。

下記の (表 150) に、得られた形質転換体の番号と変異箇所・アミノ酸配列の変化・塩基配列の変化との対応を示す。

[表 1 5 0]

番号	変異箇所	アミノ酸配列の変化		塩基配列の変化	
		変異導入前	変異導入後	変異導入前	変異導入後
No. 96h	$\beta$ -218番目	Cys	Met	tgc	atg
No. 96i	$\beta$ -218番目	Cys	Ser	tgc	tcc

[実施例 1 1 8] 改変前のニトリルヒドラーゼと改変後の改変酵素との形質比較 (1)

500mLのバッフル付三角フラスコに40 $\mu$ g/mLの硫酸第二鉄・七水和物及び10 $\mu$ g/mLの塩化コバルト・六水和物を含む100mLのLB液体培地を5つ調製し、121 $^{\circ}$ C・20分間のオートクレーブにより滅菌した。各々の培地に終濃度が100 $\mu$ g/mLとなるようにアンピシリンを添加した。

各々の培地に実施例 8 4にて得られた形質転換体No. 200と実施例 8 8にて得られた形質転換体No. 201から204の計5種類の形質転換体を1種類ずつ各々5つの培地に一白金耳植菌した。37 $^{\circ}$ C・130rpmにて約20時間培養した後、各々の培養終了液から遠心分離(5000G $\times$ 15分間)により各形質転換体を分離した。続いて、分離した各形質転換体を50mLの生理食塩水に各々再懸濁した後に、再度遠心分離(5000G $\times$ 15分間)により各形質転換体を分離した。

各形質転換体0.1gを20mLの50mMリン酸カリウム水溶液(pH7.0)に各々懸濁した後、10mL $\times$ 2本に分注した。従って各形質転換体当り2本、合計10本の懸濁液が準備された。各形質転換体の懸濁液の1本には1mLのアクリロニトリルを、もう1本にはメタアクリロニトリルを添加して、30 $^{\circ}$ Cで緩やかに攪拌しながら10分間反応させた。

反応終了後、HPLCを用いて各反応終了液の分析を行った結果、各液中には反応しきれなかった基質であるニトリル化合物(アクリロニトリル又はメタクリロニトリル)と、反応によって生じた生成物である対応するアミド化合物(アクリルアミド又はメタクリルアミド)とが存在していた。尚、対応する有機酸(ア

クリル酸又はメタクリル酸)の存在は認められなかった。

各形質転換体ごとに、アクリロニトリルを基質とする反応で生成したアクリルアミドとメタクリロニトリルを基質とする反応で生成したメタクリルアミドとのモル比を比較した結果、下記の(表151)に示す様な違いが観察された。アクリロニトリルとメタクリロニトリルを比較した場合、メタクリロニトリルの方が嵩高いニトリル化合物である事から、この結果は、より嵩高い基質を水和し易くなった改変酵素が得られた事を示している。

[表151]

番号	$\beta$ -48番目の アミノ酸(塩基配列)	水和活性比 (相対比)
		[メタクリロニトリルを基質とした場合] ÷ [アクリロニトリルを基質とした場合]
No. 200	Trp (t g g)	0.41 (100%)
No. 201	Tyr (t a t)	0.87 (211%)
No. 202	Val (g t g)	0.79 (192%)
No. 203	Ala (g c g)	0.67 (163%)
No. 204	Gly (g g g)	0.82 (198%)

[実施例119] 改変前のニトリルヒドラーゼと改変後の改変酵素との形質比較(2)

500mLのバッフル付三角フラスコに40 $\mu$ g/mLの硫酸第二鉄・七水和物及び10 $\mu$ g/mLの塩化コバルト・六水和物を含む100mLのLB液体培地を57つ調製し、121℃・20分間のオートクレーブにより滅菌した。各々の培地に終濃度が100 $\mu$ g/mLとなるようにアンピシリンを添加した。  
が100 $\mu$ g/mLとなるようにアンピシリンを添加した。

各々の培地に、pPT-DB1によりHB101を形質転換して得られた形質転換体No. 0と実施例89から117にて得られた形質転換体の内、No. 40、No. 40e、No. 40f、No. 42、No. 42a、No. 43、No. 44、No. 45、No. 46、No. 47、No. 48、No. 49、N

o. 50、No. 51、No. 52、No. 54、No. 55、No. 56、No. 57、No. 58、No. 59、No. 60、No. 61、No. 62、No. 63、No. 64、No. 65、No. 66、No. 67、No. 68、No. 69、No. 70、No. 71、No. 72、No. 73、No. 74、No. 75、No. 76、No. 77、No. 78、No. 79、No. 80、No. 81、No. 82、No. 83、No. 84、No. 85、No. 87、No. 88、No. 89、No. 90、No. 91、No. 92、No. 93、No. 94、No. 95の計56種類の形質転換体を1種類ずつを各々の培地に白金耳植菌した。37℃・130 rpmにて約20時間培養した後、各々の培養終了液から遠心分離（5000G×15分間）により各形質転換体を分離した。続いて、分離した各形質転換体を50mLの生理食塩水に各々再懸濁した後に、再度遠心分離（5000G×15分間）により各形質転換体を分離した。

各形質転換体0.1gを20mLの50mMリン酸カリウム水溶液（pH7.0）に各々懸濁した後、10mL×2本に分注した。従って各形質転換体当り2本、合計10本の懸濁液が準備された。各形質転換体の懸濁液の1本には1mLのアクリロニトリルを、もう1本にはメタアクリロニトリルを添加して、20℃で緩やかに攪拌しながら10分間反応させた。

反応終了後、HPLCを用いて各反応終了液の分析を行った結果、各液中には反応しきれなかった基質であるニトリル化合物（アクリロニトリル又はメタクリロニトリル）と、反応によって生じた生成物である対応するアミド化合物（アクリルアミド又はメタクリルアミド）とが存在していた。尚、対応する有機酸（アクリル酸又はメタクリル酸）の存在は認められなかった。

各形質転換体ごとに、アクリロニトリルを基質とする反応で生成したアクリルアミドとメタクリロニトリルを基質とする反応で生成したメタクリルアミドとのモル比を比較した結果、下記の（表152）（表153）（表154）に示す様な多様性が観察された。アクリロニトリルとメタクリロニトリルの嵩高さを比較した場合、メタクリロニトリルの方が嵩高いニトリル化合物である。この結果は、改変前のニトリルヒドラーゼと比較して、基質特異性の変化した改変酵素が得られた事を示している。

[表 152]

番号	水和活性比 (相対比)	水和活性比 (相対比)
	[メタクリロニトリルが基質の場合] $\div$ [アクリロニトリルが基質の場合]	[アクリロニトリルが基質の場合] $\div$ [メタクリロニトリルが基質の場合]
No. 0	0. 189 (100%)	5. 29 (100%)
No. 40	0. 219 (116%)	4. 55 ( 86%)
No. 40 e	0. 211 (112%)	4. 71 ( 89%)
No. 40 f	0. 206 (109%)	4. 87 ( 92%)
No. 42	0. 200 (106%)	4. 97 ( 94%)
No. 42 a	0. 202 (107%)	4. 92 ( 93%)
No. 43	0. 185 ( 98%)	5. 40 (102%)
No. 44	0. 185 ( 98%)	5. 40 (102%)
No. 45	0. 187 ( 99%)	5. 34 (101%)
No. 46	0. 185 ( 98%)	5. 40 (102%)
No. 47	0. 181 ( 96%)	5. 50 (104%)
No. 48	0. 187 ( 99%)	5. 34 (101%)
No. 49	0. 208 (110%)	4. 81 ( 91%)
No. 50	0. 198 (105%)	5. 03 ( 95%)
No. 51	0. 187 ( 99%)	5. 34 (101%)
No. 52	0. 202 (107%)	4. 92 ( 93%)
No. 54	0. 153 ( 81%)	6. 51 (123%)
No. 55	0. 159 ( 84%)	6. 30 (119%)
No. 56	0. 204 (108%)	4. 92 ( 93%)
No. 57	0. 168 ( 89%)	5. 92 (112%)

[表 1 5 3]

番号	水和活性比 (相対比)	水和活性比 (相対比)
	[メタクリロニトリルが基質の場合]	[アクリロニトリルが基質の場合]
	÷ [アクリロニトリルが基質の場合]	÷ [メタクリロニトリルが基質の場合]
No. 58	0. 159 ( 84%)	6. 30 (119%)
No. 59	0. 183 ( 97%)	5. 45 (103%)
No. 60	0. 160 ( 85%)	6. 24 (118%)
No. 61	0. 195 (103%)	5. 13 ( 97%)
No. 62	0. 210 (111%)	4. 76 ( 90%)
No. 63	0. 198 (105%)	5. 03 ( 95%)
No. 64	0. 155 ( 82%)	6. 45 (122%)
No. 65	0. 206 (109%)	4. 87 ( 92%)
No. 66	0. 180 ( 95%)	5. 55 (105%)
No. 67	0. 172 ( 91%)	5. 82 (110%)
No. 68	0. 399 (211%)	2. 49 ( 47%)
No. 69	0. 259 (137%)	3. 86 ( 73%)
No. 70	0. 212 (112%)	4. 71 ( 89%)
No. 71	0. 223 (118%)	4. 50 ( 85%)
No. 72	0. 206 (109%)	4. 87 ( 92%)
No. 73	0. 229 (121%)	4. 39 ( 83%)
No. 74	0. 233 (123%)	4. 28 ( 81%)
No. 75	0. 204 (108%)	4. 92 ( 93%)
No. 76	0. 191 (101%)	5. 24 ( 99%)
No. 77	0. 271 (142%)	3. 70 ( 70%)

[表 1 5 4]

番号	水和活性比 (相対比)	水和活性比 (相対比)
	[メタクリロニトリルが基質の場合]	[アクリロニトリルが基質の場合]
	÷ [アクリロニトリルが基質の場合]	÷ [メタクリロニトリルが基質の場合]
No. 78	0. 268 (137%)	3. 86 ( 73%)
No. 79	0. 170 ( 90%)	5. 87 (111%)
No. 80	0. 183 ( 97%)	5. 45 (103%)
No. 81	0. 180 ( 95%)	5. 56 (105%)
No. 82	0. 164 ( 87%)	6. 08 (115%)
No. 83	0. 174 ( 92%)	5. 77 (109%)
No. 84	0. 208 (110%)	4. 81 ( 91%)
No. 85	0. 164 ( 87%)	6. 08 (115%)
No. 87	0. 176 ( 93%)	5. 71 (108%)
No. 88	0. 166 ( 88%)	6. 03 (114%)
No. 89	0. 191 (101%)	5. 24 ( 99%)
No. 90	0. 197 (104%)	5. 08 ( 96%)
No. 91	0. 187 ( 99%)	5. 34 (101%)
No. 92	0. 185 ( 98%)	5. 40 (102%)
No. 93	0. 187 ( 99%)	5. 34 (101%)
No. 94	0. 193 (102%)	5. 18 ( 98%)
No. 95	0. 187 ( 99%)	5. 34 (101%)

## 産業上の利用可能性

本発明は、生体触媒を用いた物質生産の分野に於いて有用である。その例としては、ニトリルヒドラターゼと称される酵素乃至該酵素を活性発現する生体を触媒とするニトリル化合物の水和によって対応するアミド化合物に転換する物質生産を挙げる事が出来る。

## 請 求 の 範 囲

1.  $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットとを有するニトリルヒドラターゼにおいて、

前記 $\alpha$ サブユニットが、配列表の配列番号：1のアミノ酸配列の36番目、71番目、148番目及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有することを特徴とするニトリルヒドラターゼ。

2. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項1に記載のニトリルヒドラターゼ。

3. 前記 $\beta$ サブユニットが配列表の配列番号：2のアミノ酸配列を有する請求項1または2に記載のニトリルヒドラターゼ。

4. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸にさらに置換されている請求項3に記載のニトリルヒドラターゼ。

5. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項4に記載のニトリルヒドラターゼ。

6. 前記 $\beta$ サブユニット及び前記 $\alpha$ サブユニットの少なくとも一方の有する前記アミノ酸配列の前記アミノ酸置換位置以外の位置において1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラターゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項1～5に記載のニトリルヒドラターゼ。

7.  $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットとを有するニトリルヒドラターゼにおいて、

$\beta$ サブユニットが、配列表の配列番号：2のアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有することを特徴とするニトリルヒドラターゼ。

8. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項7に記載のニトリルヒドラターゼ。

9. 前記 $\alpha$ サブユニットが、配列表の配列番号：1のアミノ酸配列を有する請求項7または8に記載のニトリルヒドラターゼ。

10. 前記 $\alpha$ サブユニットの36番目、71番目、148番目及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている請求項9に記載のニトリルヒドラターゼ。

11. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項10に記載のニトリルヒドラターゼ。

12. 前記 $\alpha$ サブユニット及び前記 $\beta$ サブユニットの少なくとも一方有する前記アミノ酸配列の前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラターゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項7～11に記載のニトリルヒドラターゼ。

13. ニトリルヒドラターゼの $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子において、

前記アミノ酸配列が、配列表の配列番号：1のアミノ酸配列の36番目、71番目、148番目及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列であることを特徴とする遺伝子。

14. 前記アミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目

、187番目、194番目及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項13に記載の遺伝子。

15. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラターゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項13または14に記載の遺伝子。

16. 配列表の配列番号：3の塩基配列の106番目から108番目、211番目から213番目、442番目から444番目及び610番目から612番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項13に記載の遺伝子。

17. 前記塩基配列の16番目から18番目、55番目から57番目、112番目から114番目、229番目から231番目、268番目から270番目、304番目から306番目、316番目から318番目、376番目から378番目、388番目から390番目、424番目から426番目、436番目から438番目、559番目から561番目、580番目から582番目及び607番目から609番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列にさらに置換されている請求項16に記載の遺伝子。

18. ニトリルヒドラターゼの $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子において、

前記アミノ酸配列が、配列表の配列番号：2のアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列である遺伝子。

19. 前記アミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項18に記載の遺伝子。

20. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラターゼ活性が損

なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項18または19に記載の遺伝子。

21. 配列表の配列番号：4記載の塩基配列の28番目から30番目、94番目から96番目、109番目から111番目、121番目から123番目、136番目から138番目、142番目から144番目、151番目から153番目、214番目から216番目、352番目から354番目、379番目から381番目、436番目から438番目、478番目から480番目、556番目から558番目及び649番目から651番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項18に記載の遺伝子。

22. 前記塩基配列の58番目から60番目、61番目から63番目、322番目から324番目、598番目から600番目及び634番目から636番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列に更に置換されている請求項21に記載の遺伝子。

23. ニトリルヒドラーゼの $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子と $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子とを有するニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子において、

前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：1のアミノ酸配列の36番目、71番目、148番目及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列であることを特徴とする遺伝子。

24. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項23に記載の遺伝子。

25. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項23または24に記載の遺伝子。

26. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：3の塩基配列の106番目から108番目、211番目から213番目、442番目から444番目及び610番目から612番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項23に記載の遺伝子。

27. 前記塩基配列の16番目から18番目、55番目から57番目、112番目から114番目、229番目から231番目、268番目から270番目、304番目から306番目、316番目から318番目、376番目から378番目、388番目から390番目、424番目から426番目、436番目から438番目、559番目から561番目、580番目から582番目及び607番目から609番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列にさらに置換されている請求項26に記載の遺伝子。

28. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列が配列表の配列番号：2のアミノ酸配列である請求項23～27のいずれかに記載の遺伝子。

29. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列が、前記配列番号：2のアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列である請求項23～27のいずれかに記載の遺伝子。

30. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項29に記載の遺伝子。

31. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項29または30に記載の遺伝子。

32. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：4の塩基配列を有する請求項28に記載の遺伝子。

33. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配

列番号：4記載の塩基配列の28番目から30番目、94番目から96番目、109番目から111番目、121番目から123番目、136番目から138番目、142番目から144番目、151番目から153番目、214番目から216番目、352番目から354番目、379番目から381番目、436番目から438番目、478番目から480番目、556番目から558番目及び649番目から651番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項29に記載の遺伝子。

34. 前記塩基配列の58番目から60番目、61番目から63番目、322番目から324番目、598番目から600番目及び634番目から636番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列に更に置換されている請求項33に記載の遺伝子。

35. ニトリルヒドラーゼの $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子と $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子とを有するニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子において、

前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：2のアミノ酸配列の10番目、32番目、37番目、41番目、46番目、48番目、51番目、72番目、118番目、127番目、146番目、160番目、186番目及び217番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列であることを特徴とする遺伝子。

36. 前記アミノ酸配列の20番目、21番目、108番目、200番目及び212番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項35に記載の遺伝子。

37. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項35または36に記載の遺伝子。

38. 前記 $\beta$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする塩基配列が、配列表の配列番号：4記載の塩基配列の28番目から30番目、94番目から96番目、109番目から111番目、121番目から123番目、136番目から138

番目、142番目から144番目、151番目から153番目、214番目から216番目、352番目から354番目、379番目から381番目、436番目から438番目、478番目から480番目、556番目から558番目及び649番目から651番目の何れか一つ以上の塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項35に記載の遺伝子。

39. 前記塩基配列の58番目から60番目、61番目から63番目、322番目から324番目、598番目から600番目及び634番目から636番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列に更に置換されている請求項38に記載の遺伝子。

40. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：1のアミノ酸配列を有する請求項35～39のいずれかに記載の遺伝子。

41. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列が、配列表の配列番号：1のアミノ酸配列の36番目、71番目、148番目及び204番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列である請求項35～39のいずれかに記載の遺伝子。

42. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の6番目、19番目、38番目、77番目、90番目、102番目、106番目、126番目、130番目、142番目、146番目、187番目、194番目及び203番目のアミノ酸の何れか一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に更に置換されている請求項41に記載の遺伝子。

43. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列の有する前記アミノ酸置換位置以外の位置において、1個または数個のアミノ酸が、ニトリルヒドラーゼ活性が損なわれない範囲で置換、挿入または削除されている請求項41または42に記載の遺伝子。

44. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：3の塩基配列を有する請求項40に記載の遺伝子。

45. 前記 $\alpha$ サブユニットのアミノ酸配列をコードする遺伝子が、配列表の配列番号：3の塩基配列の106番目から108番目、211番目から213番目、442番目から444番目及び610番目から612番目の何れか一つ以上の

塩基配列を他の塩基配列に置換して得られる塩基配列を有する請求項 4 1 に記載の遺伝子。

4 6. 前記塩基配列の 1 6 番目から 1 8 番目、5 5 番目から 5 7 番目、1 1 2 番目から 1 1 4 番目、2 2 9 番目から 2 3 1 番目、2 6 8 番目から 2 7 0 番目、3 0 4 番目から 3 0 6 番目、3 1 6 番目から 3 1 8 番目、3 7 6 番目から 3 7 8 番目、3 8 8 番目から 3 9 0 番目、4 2 4 番目から 4 2 6 番目、4 3 6 番目から 4 3 8 番目、5 5 9 番目から 5 6 1 番目、5 8 0 番目から 5 8 2 番目及び 6 0 7 番目から 6 0 9 番目の何れか一つ以上の塩基配列が他の塩基配列にさらに置換されている請求項 4 5 に記載の遺伝子。

4 7. 請求項 1 ～ 1 2 のいずれかに記載のニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を有することを特徴とするプラスミド。

4 8. 前記ニトリルヒドラーゼの  $\alpha$  サブユニットをコードする遺伝子が、配列番号：3 の塩基配列または請求項 1 3 ～ 1 7 のいずれかに記載の遺伝子である請求項 4 7 に記載のプラスミド。

4 9. 前記ニトリルヒドラーゼの  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子が、配列番号：4 の塩基配列または請求項 1 8 ～ 2 2 のいずれかに記載の遺伝子である請求項 4 7 または 4 8 に記載のプラスミド。

5 0. 請求項 2 3 ～ 4 6 のいずれかに記載のニトリルヒドラーゼをコードする遺伝子を有することを特徴とするプラスミド。

5 1. 前記ニトリルヒドラーゼの宿主細胞での発現のための構成を有する請求項 4 7 ～ 5 0 のいずれかに記載のプラスミド。

5 2. 請求項 5 1 に記載のプラスミドによって宿主細胞を形質転換して得られた形質転換体。

5 3. ニトリルヒドラーゼの生産方法において、

請求項 5 2 に記載の形質転換体を培地で培養して、該形質転換体に前記プラスミドの有するニトリルヒドラーゼ遺伝子に基づくニトリルヒドラーゼを生産させる工程を有することを特徴とする生産方法。

5 4. 前記培養後の形質転換体、培養液及びそれらの処理物からニトリルヒドラーゼを回収する工程を更に有する請求項 5 3 に記載の生産方法。

55. ニトリル化合物を水性媒体中でニトリルヒドラターゼを接触させて対応するニトリル化合物を得るニトリル化合物の製造方法において、

前記ニトリルヒドラターゼが請求項1～12のいずれかに記載のものであることを特徴とする製造方法。

56. ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(a) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列及び配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

(b) アラインメント結果から、配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列中の36番目スレオニンより48番目アスパラギンに至る領域、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列中の31番目リジンより51番目フェニルアラニンに至る領域、及び112番目リジンより127番目ロイシンに至る領域に相当するアミノ酸残基を特定する、

(c) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

57. ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(d) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列及び配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

(e) アラインメント結果から、配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列中の36・48・71・148・188・204番目に相当するアミノ酸残基、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列中の10・32・33・37・40・41

・ 46 ・ 48 ・ 51 ・ 61 ・ 72 ・ 112 ・ 118 ・ 127 ・ 146 ・ 150 ・  
160 ・ 168 ・ 171 ・ 176 ・ 186 ・ 217 ・ 218 番目に相当するアミノ酸残基を特定する、

(f) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

58. ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(g) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB (Protein Data Bank) 番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(h) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖 (Chain 1IRE:A) におけるN末から数えて2番目のヘリックス、及びB鎖 (Chain 1IRE:B) におけるN末から数えて1番目のヘリックス、2番目のヘリックス、及びそれらには含まれたループ部分とC末から数えて3番目のヘリックスに相当する領域のアミノ酸残基を特定する、

(i) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

59. ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(j) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(k) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸残基であるグルタミン、165番目のアミノ酸残基であるグルタミン酸に相当するアミノ酸残基、

及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸残基であるフェニルアラニン、48番目のアミノ酸であるロイシンに相当する4つのアミノ酸残基を特定する、

(1) 特定された4つのアミノ酸残基の側鎖先端重原子を各々中心点とした立体構造上半径5 Å内の範囲に側鎖先端重原子が含まれるアミノ酸残基を特定する、

(m) 上記1で特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

60. ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(n) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたアラインメントを行う事により推定する、

(o) 推定された立体構造に基づき、基質が酵素外部から活性中心に向かう際や生成物が活性中心から酵素外部に向かう際に通過する空洞を形成する領域を特定する、

(p) 特定された領域を構成するアミノ酸残基の内、それを変更する事が空洞の大きさを変化させ、延いては基質／生成物の通過し易さ／し難さを制御するアミノ酸残基を特定する、

(q) 上記pで特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

61. ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素において、以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除することにより、該酵素の活性・基質特異性・ $V_{max}$ ・ $K_m$ ・熱安定性・基質に対する安定性・生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、

(r) 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の立体構造を、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラターゼ立体構造と、アミノ酸配列に基づいたア

ラインメントを行う事により推定する、

(s) 推定された立体構造に基づき、PDB番号1IRE記載のニトリルヒドラーゼ立体構造中のA鎖におけるN末から89番目のアミノ酸であるグルタミン(A89Q)、165番目のアミノ酸であるグルタミン酸(A165E)に相当するアミノ酸残基、及びB鎖のN末から37番目のアミノ酸であるフェニルアラニン(B37F)、48番目のアミノ酸であるロイシン(B48L)に相当するアミノ酸残基の4つのアミノ酸残基を特定する、

(t) A165Eに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd1、A89Qに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd2、B37Fに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd3と規定し、d1から3の1つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する、

(u) 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

62. (t)の工程が以下の(t')のとおりである請求項61に記載の改変方法、

(t') A165Eに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd1、A89Qに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd2、B37Fに相当するアミノ酸残基とB48Lに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd3、A165Eに相当するアミノ酸残基とB37Fに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd4、A89Qに相当するアミノ酸残基とB37Fに相当するアミノ酸残基との最短重原子間距離をd5と規定し、d1から5の1つ以上を変化させるアミノ酸残基を特定する。

63. 改変前のニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素が下記の[A]と[B]の2種類のポリペプチドを含む事の特徴とする請求項56から62の何れか一項記載の改変方法、

[A] 配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列と40%以上の相同性を示すアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[B] 配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列と25%以上の相同性を示すア

ミノ酸配列から成るポリペプチド。

64. [A] のポリペプチドが下記 [C] のポリペプチドであり、[B] のポリペプチドが下記 [D] ポリペプチドである事を特徴とする請求項63記載の改変方法、

[C] 配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列、配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列の少なくとも1箇所に関して置換、挿入又は削除を行ったアミノ酸配列、配列表の配列番号98記載のアミノ酸配列の6・19・38・77・90・102・106・126・130・142・146・187・194・203番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列、の何れかのアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[D] 配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列の少なくとも1箇所に関して置換、挿入又は削除を行ったアミノ酸配列、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列の20・21・108・200・212番目のアミノ酸の少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列、の何れかのアミノ酸配列から成るポリペプチド。

65. [A] のポリペプチドが下記 [E] のポリペプチドであり、[B] のポリペプチドが下記 [F] のポリペプチドである事を特徴とする請求項63記載の改変方法、

[E] 配列表の配列番号104記載の塩基配列の704番目から1315番目によって成るORF（オープンリーディングフレーム）がコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド、

[F] 配列表の配列番号104記載の塩基配列の1番目から680番目によって成るORFがコードするアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列から成るポリペプチド。

66. 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素が構成要素として含む2種のポリペプチドの内、1つが請求項65記載の[E]のポリペプチドであり、もう1つのポリペプチドが請求項65記載の[F]のポリペプチドである事を特徴とし、且つ以下の工程により特定のアミノ酸残基を特定し、特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行うことにより、該酵素の活

性、基質特異性、 $V_{max}$ 、 $K_m$ 、熱安定性、基質に対する安定性、生成物に対する安定性の何れか1つ以上の性質を変化させる改変方法、(d') 改変前のニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素のアミノ酸配列を、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列とアラインメントする、

(e') アラインメント結果から、配列表の配列番号99記載のアミノ酸配列中の48・51番目に相当するアミノ酸残基を特定する、

(f') 特定されたアミノ酸残基の内の1箇所以上に置換、挿入又は削除を行う。

67. [A] のポリペプチドが下記 [G] のポリペプチドである事を特徴とする請求項63記載の改変方法、

[G] アミノ酸配列 $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$ で表される領域を含むポリペプチド

(ここにおいて、Cはシステインを、Xはセリン又はスレオニンを、Lはロイシンを、 $C_1$ はシステインスルフィニ酸 (CYSTEINE SULFINIC ACID・3-SULFINOALANINE) を、Sはセリンを、 $C_2$ はシステインスルフェン酸 (CYSTEINE SULFENIC ACID・S-HYDROXY-CYSTEINE) を、 $X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot X_4 \cdot X_5$ は任意のアミノ酸を示す。))。

68.  $X_1$ がバリン、 $X_4$ がトリプトファン、 $X_5$ がプロリンである事を特徴とする請求項67記載の改変方法。

69.  $X_2$ がチロシン、 $X_3$ がプロリンである事を特徴とする請求項68記載の改変方法。

70.  $X_1CXLC_1SC_2X_2X_3X_4X_5$ で表される領域を介して金属原子と結合している事を特徴とする請求項67から69の何れか一項記載の改変方法。

71. 金属原子がコバルト原子である事を特徴とする請求項70記載の改変方法。

72. 請求項56から71の何れか一項記載の改変方法により得られる事を特徴とする改変酵素。

73. 請求項72記載の改変酵素をコードする遺伝子。

74. 請求項73記載の遺伝子を含む事を特徴とするプラスミド。

7.5. 微生物を請求項7 3記載の遺伝子又は請求項7 4記載のプラスミドを用いる形質転換をすることにより得られる事を特徴とする形質転換体。

7 6. 請求項7 5記載の形質転換体を培養して得られる培養液、細胞、又はそれらの処理物から改変酵素を回収する工程を含む事を特徴とする改変酵素の調製方法。

7 7. 請求項7 5記載の形質転換体を培養して得られる培養液、細胞、又はそれらの処理物、又は請求項7 6記載の調製方法により得られる改変酵素をニトリル化合物と溶媒中で接触させる事により該ニトリル化合物を対応するアミド化合物へと転化させる工程を含む事を特徴とするアミド化合物製造方法。

図 1

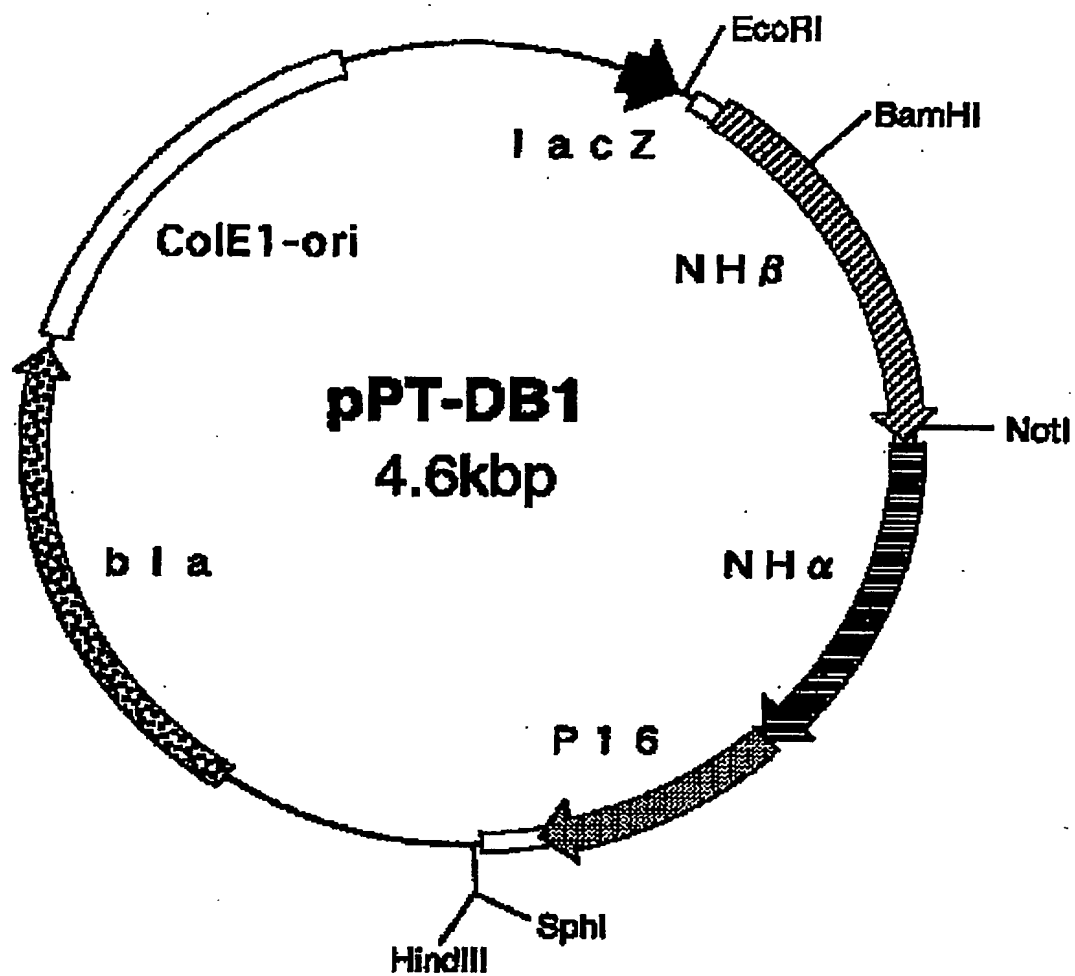
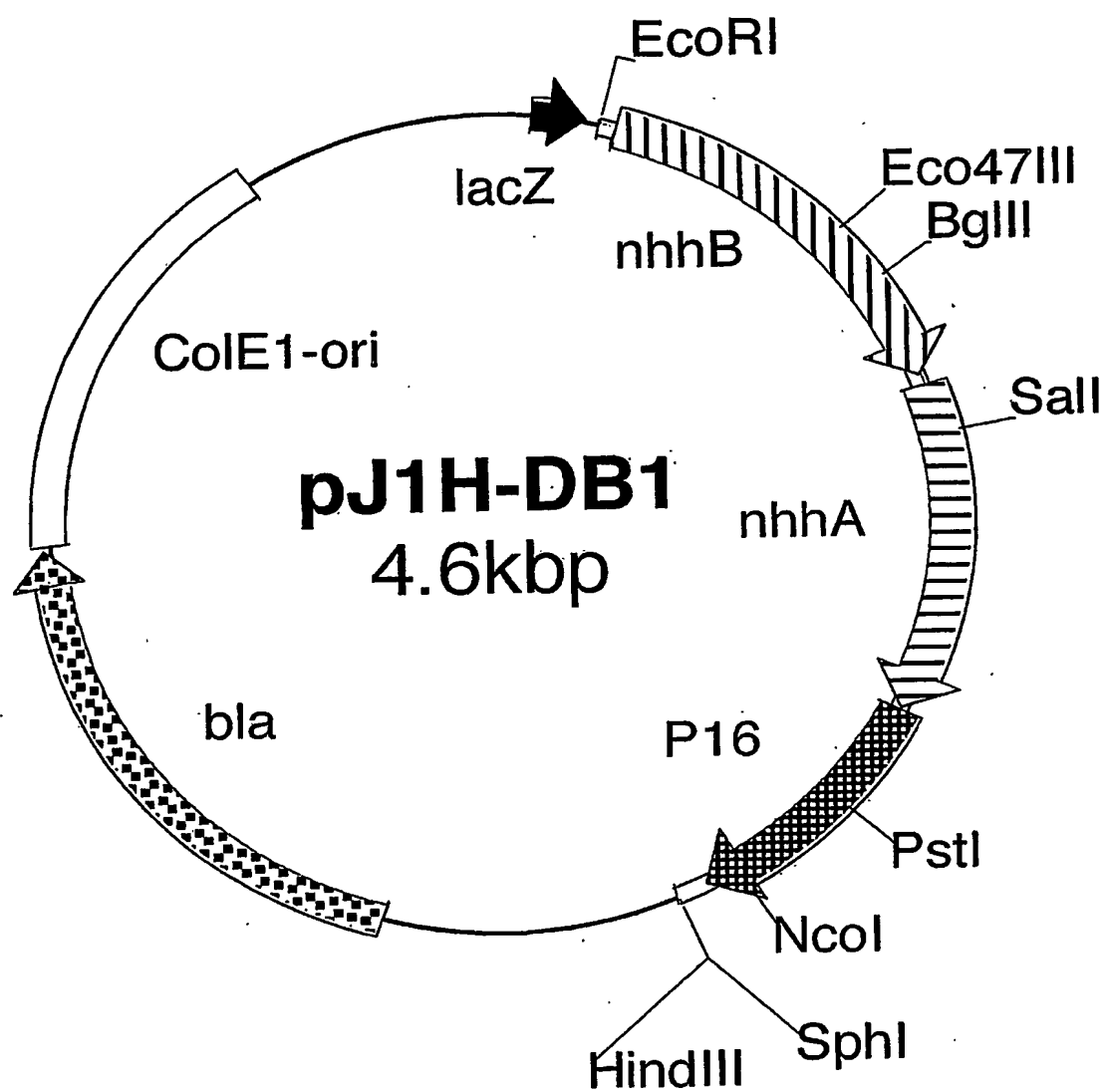


図 2



## SEQUENCE LISTING

<110> MITSUI CHEMICALS, INC.

<120> A novel nitrile hydratase

<130> F000286

<160> 139

<210> 1

<211> 205

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..205

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..205

<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"  
/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 1

Met Thr Glu Asn Ile Leu Arg Lys Ser Asp Glu Glu Ile Gln Lys Glu

5

10

15

Ile Thr Ala Arg Val Lys Ala Leu Glu Ser Met Leu Ile Glu Gln Gly

20

25

30

Ile Leu Thr Thr Ser Met Ile Asp Arg Met Ala Glu Ile Tyr Glu Asn

35

40

45

Glu Val Gly Pro His Leu Gly Ala Lys Val Val Val Lys Ala Trp Thr

50

55

60

Asp Pro Glu Phe Lys Lys Arg Leu Leu Ala Asp Gly Thr Glu Ala Cys

65

70

75

80

Lys Glu Leu Gly Ile Gly Gly Leu Gln Gly Glu Asp Met Met Trp Val

85

90

95

Glu Asn Thr Asp Glu Val His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser

100

105

110

Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Asn Trp Phe Lys Glu

115

120

125

Pro Gln Tyr Arg Ser Arg Val Val Arg Glu Pro Arg Gln Leu Leu Lys

130

135

140

Glu Glu Phe Gly Phe Glu Val Pro Pro Ser Lys Glu Ile Lys Val Trp

145

150

155

160

Asp Ser Ser Ser Glu Met Arg Phe Val Val Leu Pro Gln Arg Pro Ala

165 170 175  
Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Glu Glu Leu Ala Thr Leu Val Thr Arg  
180 185 190  
Glu Ser Met Ile Gly Val Glu Pro Ala Lys Ala Val Ala  
195 200 205

<210> 2  
<211> 223  
<212> PRT  
<213> Pseudonocardia thermophila

<220>  
<221> source  
<222> 1..223  
<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

<220>  
<221> CDS  
<222> 1..223  
<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"  
/product="nitrile hydratase beta subunit"

<400> 2  
Met Asn Gly Val Tyr Asp Val Gly Gly Thr Asp Gly Leu Gly Pro Ile  
5 10 15

Asn Arg Pro Ala Asp Glu Pro Val Phe Arg Ala Glu Trp Glu Lys Val

20

25

30

Ala Phe Ala Met Phe Pro Ala Thr Phe Arg Ala Gly Phe Met Gly Leu

35

40

45

Asp Glu Phe Arg Phe Gly Ile Glu Gln Met Asn Pro Ala Glu Tyr Leu

50

55

60

Glu Ser Pro Tyr Tyr Trp His Trp Ile Arg Thr Tyr Ile His His Gly

65

70

75

80

Val Arg Thr Gly Lys Ile Asp Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Thr Gln

85

90

95

Tyr Tyr Arg Glu Asn Pro Asp Ala Pro Leu Pro Glu His Glu Gln Lys

100

105

110

Pro Glu Leu Ile Glu Phe Val Asn Gln Ala Val Tyr Gly Gly Leu Pro

115

120

125

Ala Ser Arg Glu Val Asp Arg Pro Pro Lys Phe Lys Glu Gly Asp Val

130

135

140

Val Arg Phe Ser Thr Ala Ser Pro Lys Gly His Ala Arg Arg Ala Arg

145

150

155

160

Tyr Val Arg Gly Lys Thr Gly Thr Val Val Lys His His Gly Ala Tyr

165 170 175  
Ile Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His  
180 185 190  
Leu Tyr Thr Val Arg Phe Thr Ala Gln Glu Leu Trp Gly Pro Glu Gly  
195 200 205  
Asp Pro Asn Ser Ser Val Tyr Tyr Asp Cys Trp Glu Pro Tyr Ile Glu  
210 215 220  
Leu Val Asp Thr Lys Ala Ala Ala Ala  
225 230 233

<210> 3

<211> 618

<212> DNA

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..618

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..618

<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"  
/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 3

atgaccgaga acatcctgcg caagtcggac gaggagatcc agaaggagat cacggcgcgg 60  
gtcaaggccc tggagtcgat gctcatcgaa cagggcatcc tcaccacgtc gatgatcgac 120  
cggatggccg agatctacga gaacgaggtc ggcccgacc tcggcgcgaa ggtcgtcgtg 180  
aaggcctgga ccgacccgga gttcaagaag cgtctgctcg ccgacggcac cgaggcctgc 240  
aaggagctcg gcatcggcgg cctgcagggc gaggacatga tgtgggtgga gaacaccgac 300  
gaggtcacc acgtcgtcgt gtgcacgctc tgctcctgct acccgtggcc ggtgctgggg 360  
ctgccgccga actggttcaa ggagccgcag taccgctccc gcgtggtgcg tgagccccgg 420  
cagctgtca aggaggagt cggcttcgag gtcccgccga gcaaggagat caaggtctgg 480  
gactccagct ccgagatgcg cttcgtcgtc ctccgcagc gccccgcggg caccgacggg 540  
tggagcgagg aggagctcgc caccctcgtc acccgcgagt cgatgatcgg cgtcgaaccg 600  
gcgaaggcgg tcgctga 618

<210> 4

<211> 702

<212> DNA

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..702

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..702

<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"  
/product="nitrile hydratase beta subunit"

<400> 4

atgaacggcg tgtacgacgt cggcggcacc gatgggctgg gcccgatcaa ccggcccgcg 60  
gacgaaccgg tcttccgcgc cgagtgggag aaggtcgcgt tcgcatgtt cccggcgacg 120  
ttccggggccg gcttcatggg cctggacgag ttccggttcg gcatcgagca gatgaaccgg 180  
gccgagtacc tcgagtcgcc gtactactgg cactggatcc gcacctacat ccaccacggc 240  
gtccgcaccg gcaagatcga tctcgaggag ctggagcgcc gcacgcagta ctaccgggag 300  
aaccccgacg ccccgctgcc cgagcacgag cagaagccgg agttgatcga gttcgtcaac 360  
caggccgtct acggcgggct gcccgaagc cgggaggtcg accgaccgcc caagttcaag 420

gagggcgacg tggcgcggtt ctccaccgcg agcccgaagg gccacgcccg gcgcgcgcgg 480  
tacgtgcgcg gcaagaccgg gacggtggc aagcaccacg gcgcgtacat ctaccggac 540  
accgccggca acggcctggg cgagtgcgcc gagcacctct acaccgtccg cttcacggcc 600  
caggagctgt gggggccgga aggggacccg aactccagcg tctactacga ctgctgggag 660  
ccctacatcg agctcgtcga cacgaaggcg gccgcggcat ga 702

<210> 5

<211> 144

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..144

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..144

<223> /gene="gene encoding protein participation in the activation of  
nitrile hydratase"

/product="protein participation in the activation of nitrile

hydratase

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; INT#MET

&lt;222&gt; 1

&lt;400&gt; 5

Met Ser Ala Glu Ala Lys Val Arg Leu Lys His Cys Pro Thr Ala Glu

1

5

10

15

Asp Arg Ala Ala Ala Asp Ala Leu Leu Ala Gln Leu Pro Gly Gly Asp

20

25

30

Arg Ala Leu Asp Arg Gly Phe Asp Glu Pro Trp Gln Leu Arg Ala Phe

35

40

45

Ala Leu Ala Val Ala Ala Cys Arg Ala Gly Arg Phe Glu Trp Lys Gln

50

55

60

Leu Gln Gln Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Glu Trp Glu Arg Thr His

65

70

75

80

Asp Leu Asp Asp Pro Ser Trp Ser Tyr Tyr Glu His Phe Val Ala Ala

85

90

95

Leu Glu Ser Val Leu Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu Pro Glu Ala Leu

100

105

110

Asp Glu Arg Thr Ala Glu Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Lys Asp His

115

120

125

His Gly Pro His Leu Glu Pro Val Ala Val His Pro Ala Val Arg Ser

130

135

140

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 435

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pseudonocardia thermophila

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; source

&lt;222&gt; 1..435

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 1..435

<223> /gene="gene encoding protein participation in the activation of  
nitrile hydratase"/product="protein participation in the activation of nitrile  
hydratase"

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; int#codon

&lt;222&gt; 1..3

&lt;400&gt; 6

gtgagcgccg aggcgaaggt ccgcctgaag cactgcccc aaggccgagga ccggcgccg 60  
gccgacgcgc tgctcgcgca gctgcccggc ggcgaccgcg cgctcgaccg cggcttcgac 120  
gagccgtggc agctcgggc gttcgcgctg gcggtcgcgg cgtgcagggc gggccggttc 180  
gagtggaagc agctgcagca ggcgctgac tctcgatcg gggagtggga gcgcacccac 240  
gatctcgacg atccgagctg gtcctactac gagcattcg tcgccgcgct ggaatccgtg 300  
ctcggcgagg aagggatcgt cgagccggag gcgctggacg agcgcaccgc ggaggtcttg 360  
gccaacccgc cgaacaagga tcacatgga ccgcatctgg agcccgtcgc ggtccaccgc 420  
gccgtgcggt cctga 435

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide to act as a PCR primer

&lt;400&gt; 7

aacatcatgc gcaagtcg

18

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 8

gttttcccag tcacgac

17

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 9

ggccagtgcc tagcttacat

20

<210> 10

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 10

caggaaacag ctatgac

17

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 11

aacatcacgc gcaagtcg

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 12

aacatcgcg gcaagtcg

18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 13

.aacatcggtgc gcaagtcg

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 14

atcacggtgc ggggtcaag

18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 15

acgtcgttga tcgaccgg

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 16

gacggctccg aggcctgc

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 17

ctgcaggccg aggacatg

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 18

gacgaggccc accacgtc

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 19

cacgtcatcg tgtgcacg

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 20

aactggtaca aggagccg

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 21

gagccggagt accgctcc

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 22

cggcaggtgc tcaaggag

18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 23

aaggaggact tcggcttc

18

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 24

gagctcacca ccctcgtc

18

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 25

cgcgagttga tgatcggc

18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 26

gcgaaggagg tcgcgtga

18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 27

cggcccgtgg acgaaccg

18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 28

cccgcgaaacg aaccggtc

18

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 29

ctgcccgatc acgagcag

18

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 30

ctgcccccgac acgagcag

18

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 31

ctgccctcgc acgagcag

18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 32

ctgccccggc acgagcag

18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 33

ctgccctgcc acgagcag

18

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 34

ctgcccctgc acgagcag

18

<210> 35

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 35

ctgcccacgc acgagcag

18

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 36

ttcacggacc aggagctg

18

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 37

ttcacgatcc aggagctg

18

<210> 38

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 38

ttcacggtcc aggagctg

18

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 39

ttcacggagc aggagctg

18

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 40

ccgaactaca gcgtctac

18

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 41

ctcaccatgt cgatgatc

18

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 42

aagaagcatc tgctcgcc

18

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 43

gagttcgact tcgaggtc

18

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 44

aaggcgcgcg cgtgagcg

18

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 45

aaggcgaaag cgtgagcg

18

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 46

aaggcgtggg cgtgagcg

18

<210> 47

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 47

aaggcgaccg cgtgagcg

18

<210> 48

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 48

ggcggcgacg atgggctg

18

<210> 49

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 49

ggcggcgaag atgggctg

18

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 50

ggcggctggg atgggctg

18

<210> 51

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 51

ggcggcggcg atgggctg

18

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 52

ggcggctacg atgggctg

18

<210> 53

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 53

ggcggctgcg atgggctg

18

<210> 54

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 54

gagaaggcg cggtcgcg

18

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 55

gcgatgacc cggcgacg

18

<210> 56

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 56

gcgatggccc cggcgacg

18

<210> 57

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 57

gcgatgctcc cggcgacg

18

<210> 58

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 58

gcgatgatcc cggcgacg

18

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 59

gcgatggtcc cggcgacg

18

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 60

gcgacggaac gggccggc

18

<210> 61

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 61

gcgacgaccc gggccggc

18

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 62

gcgacggccc gggccggc

18

<210> 63

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 63

gcgacgctcc gggccggc

18

<210> 64

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 64

gcgacgatcc gggccggc

18

<210> 65

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 65

gcgacggtcc gggccggc

18

<210> 66  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 66  
ggcttcgggg gcctggac

18

<210> 67  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 67  
ggcttctatg gcctggac

18

<210> 68  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 68

ggcttcctgg gcctggac

18

<210> 69

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 69

ggcttcaagg gcctggac

18

<210> 70

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 70

ggcttcgatg gcctggac

18

<210> 71

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 71

atgggcgggg acgagttc

18

<210> 72

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 72

atgggcgcgg acgagttc

18

<210> 73

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 73

atgggcgtgg acgagttc

18

<210> 74

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 74

atgggctcgg acgagttc

18

<210> 75

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 75

atgggcacgg acgagttc

18

<210> 76

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 76

atgggccggg acgagttc

18

<210> 77

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 77

gacgaggccc ggttcggc

18

<210> 78

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 78

gacgagtccc ggttcggc

18

<210> 79

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 79

tggcacttta tccgcacc

18

<210> 80

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 80

atcgaggccg tcaaccag

18

<210> 81

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 81

atcgagctcg tcaaccag

18

<210> 82

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 82

atcgagctcg tcaaccag

18

<210> 83

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 83

atcgaggtcg tcaaccag

18

<210> 84

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 84

ggcggggcgc ccgcaagc

18

<210> 85

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 85

ggcggggtgc ccgcaagc

18

<210> 86

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 86

ggcgggtcgc ccgcaagc

18

<210> 87

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 87

gtggtgggt tctccacc

18

<210> 88

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 88

cgcgcgctgt acgtgcgc

18

<210> 89

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 89

cgcgcggtgt acgtgcgc

18

<210> 90

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 90

aacggcagg gcgagtgc

18

<210> 91

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 91

aacggcgatg gcgagtgc

18

<210> 92

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 92

aacggcaagg gcgagtgc

18

<210> 93

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 93

aacggccggg gcgagtgc

18

<210> 94

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 94

aacggcaacg gcgagtgc

18

<210> 95

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 95

aacggctcgg gcgagtgc

18

<210> 96

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 96

aacggcgggg gcgagtgc

18

<210> 97

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 97

tactacggct gctgggag

18

<210> 98

<211> 205

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..205

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..205

<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"  
/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 98

Met Thr Glu Asn Ile Leu Arg Lys Ser Asp Glu Glu Ile Gln Lys Glu

5

10

15

Ile Thr Ala Arg Val Lys Ala Leu Glu Ser Met Leu Ile Glu Gln Gly  
20 25 30

Ile Leu Thr Thr Ser Met Ile Asp Arg Met Ala Glu Ile Tyr Glu Asn  
35 40 45

Glu Val Gly Pro His Leu Gly Ala Lys Val Val Val Lys Ala Trp Thr  
50 55 60

Asp Pro Glu Phe Lys Lys Arg Leu Leu Ala Asp Gly Thr Glu Ala Cys  
65 70 75 80

Lys Glu Leu Gly Ile Gly Gly Leu Gln Gly Glu Asp Met Met Trp Val  
85 90 95

Glu Asn Thr Asp Glu Val His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser  
100 105 110

Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Asn Trp Phe Lys Glu  
115 120 125

Pro Gln Tyr Arg Ser Arg Val Val Arg Glu Pro Arg Gln Leu Leu Lys  
130 135 140

Glu Glu Phe Gly Phe Glu Val Pro Pro Ser Lys Glu Ile Lys Val Trp  
145 150 155 160

Asp Ser Ser Ser Glu Met Arg Phe Val Val Leu Pro Gln Arg Pro Ala  
165 170 175

Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Glu Glu Leu Ala Thr Leu Val Thr Arg  
180 185 190

Glu Ser Met Ile Gly Val Glu Pro Ala Lys Ala Val Ala  
195 200 205

<210> 99

<211> 223

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..223

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..223

<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"  
/product="nitrile hydratase beta subunit"

<400> 99

Met Asn Gly Val Tyr Asp Val Gly Gly Thr Asp Gly Leu Gly Pro Ile  
5 10 15

Asn Arg Pro Ala Asp Glu Pro Val Phe Arg Ala Glu Trp Glu Lys Val  
20 25 30

Ala Phe Ala Met Phe Pro Ala Thr Phe Arg Ala Gly Phe Met Gly Leu  
35 40 45

Asp Glu Phe Arg Phe Gly Ile Glu Gln Met Asn Pro Ala Glu Tyr Leu  
50 55 60

Glu Ser Pro Tyr Tyr Trp His Trp Ile Arg Thr Tyr Ile His His Gly  
65 70 75 80

Val Arg Thr Gly Lys Ile Asp Leu Glu Glu Leu Glu Arg Arg Thr Gln  
85 90 95

Tyr Tyr Arg Glu Asn Pro Asp Ala Pro Leu Pro Glu His Glu Gln Lys  
100 105 110

Pro Glu Leu Ile Glu Phe Val Asn Gln Ala Val Tyr Gly Gly Leu Pro  
115 120 125

Ala Ser Arg Glu Val Asp Arg Pro Pro Lys Phe Lys Glu Gly Asp Val  
130 135 140

Val Arg Phe Ser Thr Ala Ser Pro Lys Gly His Ala Arg Arg Ala Arg  
145 150 155 160

Tyr Val Arg Gly Lys Thr Gly Thr Val Val Lys His His Gly Ala Tyr  
165 170 175

Ile Tyr Pro Asp Thr Ala Gly Asn Gly Leu Gly Glu Cys Pro Glu His

180

185

190

Leu Tyr Thr Val Arg Phe Thr Ala Gln Glu Leu Trp Gly Pro Glu Gly

195

200

205

Asp Pro Asn Ser Ser Val Tyr Tyr Asp Cys Trp Glu Pro Tyr Ile Glu

210

215

220

Leu Val Asp Thr Lys Ala Ala Ala Ala

225

230

233

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 618

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pseudonocardia thermophila

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; source

&lt;222&gt; 1..618

&lt;223&gt; /organism="Pseudonocardia thermophila"

/strain="JCM3095"

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 1..618

&lt;223&gt; /gene="nitrile hydratase alpha subunit"

/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 100

atgaccgaga acatcctgcg caagtcggac gaggagatcc agaaggagat cacggcgcg 60  
gtcaaggccc tggagtcgat gtcacgcga cagggcatcc tcaccacgtc gatgatcgac 120  
cggatggccg agatctacga gaacgaggtc gggccgcacc tcggcgcgaa ggtcgtcgtg 180  
aaggcctgga ccgaccgga gttcaagaag cgtctgctcg ccgacggcac cgaggcctgc 240  
aaggagctcg gcatcggcgg cctgcagggc gaggacatga tgtgggtgga gaacaccgac 300  
gaggtccacc acgtcgtcgt gtgcacgtc tgctcctgct acccgtggcc ggtgctgggg 360  
ctgccgccga actggttcaa ggagccgcag taccgtccc gcgtgggtcg tgagccccgg 420  
cagctgctca aggaggagt cggcttcgag gtcccgccga gcaaggagat caaggtctgg 480  
gactccagct ccgagatgcg cttcgtcgtc ctccgcagc gccccgcggg caccgacggg 540  
tggagcgagg aggagctgc caccctcgtc acccgcgagt cgatgatcgg cgtcgaaccg 600  
gcgaaggcgg tcgctga 618

<210> 101

<211> 702

<212> DNA

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..702

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..702

<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"  
/product="nitrile hydratase beta subunit"

<400> 101

atgaacggcg tgtacgacgt cggcggcacc gatgggctgg gcccgatcaa ccggcccgcg 60  
gacgaaccgg tcttccgcgc cgagtgggag aaggtcgctg tcgcgatggt cccggcgacg 120  
ttccgggccg gcttcatggg cctggacgag ttccgggtcg gcatcgagca gatgaaccgc 180  
gccgagtacc tcgagtcgcc gtactactgg cactggatcc gcacctacat ccaccacggc 240  
gtccgcaccg gcaagatcga tctcgaggag ctggagcgcc gcacgcagta ctaccgggag 300  
aaccgccgacg ccccgctgcc cgagcacgag cagaagccgg agttgatcga gttcgtcaac 360  
caggccgtct acggcgggct gcccgcaagc cgggaggtcg accgaccgcc caagttcaag 420

gagggcgacg tggcgcggtt ctccaccgcg agcccgaagg gccacgcccg gcgcgcgcgg 480  
tacgtgcgcg gcaagaccgg gacggtggtc aagcaccacg gcgcgtacat ctacccggac 540  
accgccggca acggcctggg cgagtgcgcc gagcacctct acaccgtccg cttcacggcc 600  
caggagctgt gggggccgga aggggacccg aactccagcg tctactacga ctgctgggag 660  
ccctacatcg agctcgtcga cacgaaggcg gccgcggcat ga 702

<210> 102

<211> 144

<212> PRT

<213> Pseudonocardia thermophila

<220>

<221> source

<222> 1..144

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

<220>

<221> CDS

<222> 1..144

<223> /gene="gene encoding protein participation in the activation of  
nitrile hydratase"

/product="protein participation in the activation of nitrile  
hydratase"

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; INT#MET

&lt;222&gt; 1

&lt;400&gt; 102

Met Ser Ala Glu Ala Lys Val Arg Leu Lys His Cys Pro Thr Ala Glu  
1 5 10 15

Asp Arg Ala Ala Ala Asp Ala Leu Leu Ala Gln Leu Pro Gly Gly Asp  
20 25 30

Arg Ala Leu Asp Arg Gly Phe Asp Glu Pro Trp Gln Leu Arg Ala Phe  
35 40 45

Ala Leu Ala Val Ala Ala Cys Arg Ala Gly Arg Phe Glu Trp Lys Gln  
50 55 60

Leu Gln Gln Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Glu Trp Glu Arg Thr His  
65 70 75 80

Asp Leu Asp Asp Pro Ser Trp Ser Tyr Tyr Glu His Phe Val Ala Ala  
85 90 95

Leu Glu Ser Val Leu Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu Pro Glu Ala Leu  
100 105 110

Asp Glu Arg Thr Ala Glu Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Lys Asp His

115

120

125

His Gly Pro His Leu Glu Pro Val Ala Val His Pro Ala Val Arg Ser

130

135

140

&lt;210&gt; 103

&lt;211&gt; 435

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Pseudonocardia thermophila

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; source

&lt;222&gt; 1..435

<223> /organism="Pseudonocardia thermophila"  
/strain="JCM3095"

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; 1..435

<223> /gene="gene encoding protein participation in the activation of  
nitrile hydratase"/product="protein participation in the activation of nitrile  
hydratase"

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; init\_codon

&lt;222&gt; 1..3

&lt;220&gt;

<221> g or a

<222> 1..1

<400> 103

rtgagcgccg aggcgaaggt ccgcctgaag cactgcccc a cggccgagga ccgggcggcg 60

gccgacgcgc tgctcgcgca gctgcccggc ggcgaccgcg cgctcgaccg cggcttcgac 120

gagccgtggc agctgcgggc gttcgcgctg gcggtcgcgg cgtgcagggc gggccggttc 180

gagtggaagc agctgcagca ggcgctgata tcctcgatcg gggagtggga gcgcaccac 240

gatctcgacg atccgagctg gtcctactac gagcacttcg tcgccgcgct ggaatccgtg 300

ctcggcgagg aaggatcgt cgagccggag gcgctggacg agcgcaccgc ggaggtcttg 360

gccaaccgcg cgaacaagga tcacatgga ccgcatctgg agcccgtcgc ggtccacccg 420

gccgtgcggt cctga 435

<210> 104

<211> 1315

<212> DNA

<213> Rhodococcus rhodochrous

<220>

<221> source

<222> 1.. 1315

<223> /organism="Rhodococcus rhodochrous"

/strain="J1 (FERM BP-1478)"

<220>

<221> CDS

<222> 1..690

<223> /gene="nitrile hydratase beta subunit"

/product="nitrile hydratase beta subunit"

<220>

<221> CDS

<222> 704..1315

<223> /gene="nitrile hydratase alpha subunit"

/product="nitrile hydratase alpha subunit"

<400> 104

atg gat ggt atc cac gac aca ggc ggc atg acc gga tac gga ccg gtc 48

Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val

1

5

10

15

ccc tat cag aag gac gag ccc ttc ttc cac tac gag tgg gag ggt cgg 96

Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg

20

25

30

acc ctg tca att ctg act tgg atg cat ctc aag ggc ata tcg tgg tgg 144

Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Ile Ser Trp Trp

35

40

45

gac aag tcg cgg ttc ttc cgg gag tcg atg ggg aac gaa aac tac gtc 192

Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val  
 50 55 60

aac gag att cgc aac tcg tac tac acc cac tgg ctg agt gcg gca gaa 240  
 Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu  
 65 70 75 80

cgt atc ctc gtc gcc gac aag atc atc acc gaa gaa gag cga aag cac 288  
 Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His  
 85 90 95

cgt gtg caa gag atc ctt gag ggt cgg tac acg gac agg aag ccg tcg 336  
 Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Lys Pro Ser  
 100 105 110

cgg aag ttc gat ccg gcc cag atc gag aag gcg atc gaa cgg ctt cac 384  
 Arg Lys Phe Asp Pro Ala Gln Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His  
 115 120 125

gag ccc cac tcc cta gcg ctt cca gga gcg gag ccg agt ttc tct ctc 432  
 Glu Pro His Ser Leu Ala Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu  
 130 135 140

ggt gac aag atc aaa gtg aag agt atg aac ccg ctg gga cac aca cgg 480  
 Gly Asp Lys Ile Lys Val Lys Ser Met Asn Pro Leu Gly His Thr Arg  
 145 150 155 160

tgc ccg aaa tat gtg cgg aac aag atc ggg gaa atc gtc gcc tac cac 528  
 Cys Pro Lys Tyr Val Arg Asn Lys Ile Gly Glu Ile Val Ala Tyr His

165	170	175	
ggc tgc cag atc tat ccc gag agc agc tcc gcc ggc ctc ggc gac gat			576
Gly Cys Gln Ile Tyr Pro Glu Ser Ser Ser Ala Gly Leu Gly Asp Asp			
180	185	190	
cct cgc ccg ctc tac acg gtc gcg ttt tcc gcc cag gaa ctg tgg ggc			624
Pro Arg Pro Leu Tyr Thr Val Ala Phe Ser Ala Gln Glu Leu Trp Gly			
195	200	205	
gac gac gga aac ggg aaa gac gta gtg tgc gtc gat ctc tgg gaa ccg			672
Asp Asp Gly Asn Gly Lys Asp Val Val Cys Val Asp Leu Trp Glu Pro			
210	215	220	
tac ctg atc tct gcg tga aaggaatcgc ata gtg agc gag cac gtc aat			720
Tyr Leu Ile Ser Ala ***		Met Ser Glu His Val Asn	
225	229	1	5
aag tac acg gag tac gag gca cgt acc aag gcg atc gaa acc ttg ctg			768
Lys Tyr Thr Glu Tyr Glu Ala Arg Thr Lys Ala Ile Glu Thr Leu Leu			
10	15	20	
tac gag cga ggg ctc atc acg ccc gcc gcg gtc gac cga gtc gtt tcg			816
Tyr Glu Arg Gly Leu Ile Thr Pro Ala Ala Val Asp Arg Val Val Ser			
25	30	35	
tac tac gag aac gag atc ggc ccg atg ggc ggt gcc aag gtc gtg gcc			864
Tyr Tyr Glu Asn Glu Ile Gly Pro Met Gly Gly Ala Lys Val Val Ala			
40	45	50	

aag tcc tgg gtg gac cct gag tac cgc aag tgg ctc gaa gag gac gcg	912
Lys Ser Trp Val Asp Pro Glu Tyr Arg Lys Trp Leu Glu Glu Asp Ala	
55                                  60                                  65                                  70	
acg gcc gcg atg gcg tca ttg ggc tat gcc ggt gag cag gca cac caa	960
Thr Ala Ala Met Ala Ser Leu Gly Tyr Ala Gly Glu Gln Ala His Gln	
75                                  80                                  85	
att tcg gcg gtc ttc aac gac tcc caa acg cat cac gtg gtg gtg tgc	1008
Ile Ser Ala Val Phe Asn Asp Ser Gln Thr His His Val Val Val Cys	
90                                  95                                  100	
act ctg tgt tcg tgc tat ccg tgg ccg gtg ctt ggt ctc ccg ccc gcc	1056
Thr Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Ala	
105                                  110                                  115	
tgg tac aag agc atg gag tac cgg tcc cga gtg gta gcg gac cct cgt	1104
Trp Tyr Lys Ser Met Glu Tyr Arg Ser Arg Val Val Ala Asp Pro Arg	
120                                  125                                  130	
gga gtg ctc aag cgc gat ttc ggt ttc gac atc ccc gat gag gtg gag	1152
Gly Val Leu Lys Arg Asp Phe Gly Phe Asp Ile Pro Asp Glu Val Glu	
135                                  140                                  145                                  150	
gtc agg gtt tgg gac agc agc tcc gaa atc cgc tac atc gtc atc ccg	1200
Val Arg Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu Ile Arg Tyr Ile Val Ile Pro	
155                                  160                                  165	

gaa cgg ccg gcc ggc acc gac ggt tgg tcc gag gag gag ctg acg aag 1248

Glu Arg Pro Ala Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Glu Glu Leu Thr Lys

170

175

180

ctg gtg agc cgg gac tcg atg atc ggt gtc agt aat gcg ctc aca ccg 1296

Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly Val Ser Asn Ala Leu Thr Pro

185

190

195

cag gaa gtg atc gta tga

1315

Gln Glu Val Ile Val \*\*\*

200

203

<210> 105

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 105

ccggaattcg aaaggaatga ggaaatgga

29

<210> 106

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 106

aaaaagtact catacgatca cttcctgc

28

<210> 107

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 107

gttttcccag tcacgac

17

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 108

ggccagtgcc tagcttacat

20

<210> 109

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 109

caggaaacag ctatgac

17

<210> 110

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 14..16

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 110

gggcataatcg tggnnngaca agtcgcggt

29

<210> 111

<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> Any  
<222> 7..9  
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 111  
ctcaccnnnt cgatgatc

18

<210> 112  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<221> Any  
<222> 7..9  
<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 112  
tacgagnnng aggtcggc

18

<210> 113  
<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 113

aagaagnnnc tgctcgcc

18

<210> 114

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 114

gagttcnmnt tcgaggtc

18

<210> 115

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 115

ctcgccnnnc tcgtcact

18

<210> 116

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 116

aaggcgnnng cgtgagcg

18

<210> 117

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 117

ggcggcnnng atgggctg

18

<210> 118

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 118

gagaagnnng cgttcgcg

18

<210> 119

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 119

aaggtcnnnt tcgcgatg

18

<210> 120

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 120

gcgatgnnnc cggcgacg

18

<210> 121

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 121

ccggcgnnnt tccgggcc

18

<210> 122

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 122

gcgacgnnnc gggccggc

18

<210> 123

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 123

ggcttcnnng gcctggac

18

<210> 124

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 124

atgggcnnng acgagttc

18

<210> 125

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 125

gacgagnnnc ggttcggc

18

<210> 126

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 126

aacccgnnng agtacctc

18

<210> 127

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 127

tggcacnna tccgcacc

18

<210> 128

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 128

gagcagnnnc cggagttg

18

<210> 129

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 129

atcgagnnng tcaaccag

18

<210> 130

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 130

ggcgggnnc cgcgaagc

18

<210> 131

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 131

gtggtgnnnt tctccacc

18

<210> 132

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 132

tccaccnnna gcccgaag

18

<210> 133

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 133

cgcgcgnnnt acgtgcgc

18

<210> 134

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 134

accggggnng tggtaag

18

<210> 135

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 135

gtggtcnnnc accacggc

18

<210> 136

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 136

ggcgcgnna tctaccg

18

<210> 137

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 137

aacggcnng gcgagtgc

18

<210> 138

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 138

tactacnnnt gctgggag

18

<210> 139

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> Any

<222> 7..9

<223> Oligonucleotide to act as a PCR primer

<400> 139

tacgacnnnt gggagccc

18

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16014

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/88, 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N9/88, 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P13/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 9-275978 A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.), 28 October, 1997 (28.10.97), (Family: none)	1-6, 10-17, 23-34, 41-43, 45-55

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 March, 2004 (11.03.04)

Date of mailing of the international search report  
23 March, 2004 (23.03.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16014

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
(See extra sheet.)

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16014

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

## •Nitrile hydratase per se

First, the "nitrile hydratases having an  $\alpha$ -subunit and a  $\beta$ -subunit" as set forth in claims 1 to 12 will be discussed. There are presented 5 $\alpha$ -subunit types (i.e., the unsubstituted one, one having substitution at the 36-position, one having substitution at the 71-position, - - - and one having substitution at the 204-position) and 15  $\beta$ -subunit types (i.e., the unsubstituted one, one having substitution at the 10-position, one having substitution at the 32-position, - - - and one having substitution at the 217-position). That is, there are presented at least 75 types (5x15) of nitrile hydratases.

To conclude that these 75 nitrile hydratases comply with the requirement of unity of invention, they should be so linked as to form a single general inventive concept. In other words, these combinations should have a technical relationship involving the same "special technical features". The expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over "the prior art". (See, if required, PCT Rule 13.2.)

However, "JP 9-275978 A (Mitsui Toatsu Chemicals, Inc.) 1997.10.28" (hereinafter referred to as the referential document) having been publicly known before the priority date of the present case reports a plural number of "nitrile hydratases having an  $\alpha$ -subunit and a  $\beta$ -subunit" having amino acid substitutions at different positions from the above-described ones and yet substantially sustaining the nitrile hydratase function. Thus, it cannot be referred to as a "special technical feature" to merely substantially sustain the nitrile hydratase function after substitution. The fact that these 75 nitrile hydratases are obtained by a modification method not described in the referential document (for example, the modification method as set forth in claim 56) cannot be regarded as "a special technical feature", unless it can be concluded that these "substances", i.e., the 75 nitrile hydratases cannot be obtained any other method than the above modification method. Even though the statement in the description of the present case is taken into consideration, the presence of any other "special technical feature" (for example, such a technical feature that "all" of these 75 nitrile hydratases sustain higher activity than the nitrile hydratase reported in the referential document) can be neither confirmed nor designated.

Such being the case, the above-described 75 nitrile hydratases cannot be considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

The same applies to the genes, plasmids, etc. as set forth in claims 13 to 55, because of relating to the above-described 75 nitrile hydratases.

(Continued to next page)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16014

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

## •Method of modifying enzyme having nitrile hydratase activity

First, claims 56 to 71 will be discussed. Modification of nitrile hydratase per se is reported in the referential document too. In other words, a modification method has been already reported. Therefore, the modification methods as set forth in claims 56 to 71 should have a technical relationship involving the same "special technical feature" exceeding a mere modification method.

However, the invention as set forth in claim 56 and the invention as set forth in claim 57, for example, differ in sequential data, etc. to be referred in discussing the modification. The same applies to claims 58 to 71 too. Even though the statement in the description of the present case is taken into consideration, the presence of any other "special technical feature" can be neither confirmed nor designated.

Such being the case, it is considered that claims 56 to 71 have inventions relating to 16 types of modification methods as set forth in claims 56 to 71, even though dependent claims are taken into consideration.

The same applies to the modified enzymes, etc. as set forth in claims 72 to 77 because of being specified as obtained by the 16 modification methods as described above.

## •Conclusion

Even though the 75 nitrile hydratases are obtained by modification methods that are not described in the referential document (i.e., the 16 inventions relating to the methods of modifying an enzyme having nitrile hydratase activity), there is observed no "special technical feature" between the nitrile hydratases per se and the methods of modifying an enzyme having nitrile hydratase activity, unless it can be concluded that these "substances", i.e., the 75 nitrile hydratases cannot be obtained any other method than the above modification method.

Thus, it is concluded that the present case has 91 inventions in total including the 75 inventions relating to nitrile hydratases and the 16 inventions relating to methods of modifying an enzyme having nitrile hydratase activity.

Since no required additional search fees were timely paid by the applicant, the international search report is made exclusively on the part of the invention according to claim 1 relating to a nitrile hydratase in which the  $\alpha$ -subunit "has an amino acid sequence wherein the amino acid at the 36-position in SEQ ID NO:1 is substituted by another amino acid" and the parts of the inventions according to claims 2 to 6, 10 to 17, 23 to 34, 41 to 43 and 45 to 55 in which the  $\alpha$ -subunit "has an amino acid sequence wherein the amino acid at the 36-position in SEQ ID NO:1 is substituted by another amino acid" or a base sequence corresponding thereto.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> C12N 9/88, 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 13/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> C12N 9/88, 15/09, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 13/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

PubMed, BIOSIS/WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 9-275978 A (三井東圧化学株式会社) 1997. 10. 28 ファミリーなし	1-6, 10-17, 23-34, 41-43, 45-55

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11. 03. 2004

国際調査報告の発送日

23. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明

4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

(特別ページ参照)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。(特別ページ参照)

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

## (特別ページの続き)

## ・まとめ

既述したように、75個のニトリルヒドラターゼが、参考文献には記載されていない改変方法、つまり、ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の改変方法に係る16個の発明により得られたものであるとしても、75個のニトリルヒドラターゼという「物質」がそれらの改変方法以外では取得不可能なものとはいえない以上、ニトリルヒドラターゼ自体と、ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の改変方法との間には「特別な技術的特徴」は見いだせない。

以上から、この出願は、ニトリルヒドラターゼに係る75個の発明と、ニトリルヒドラターゼ活性を有する酵素の改変方法に係る16個の発明の、合計91個の発明を包含しているといえる。

そして、出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、請求の範囲1に記載された発明のうち、 $\alpha$ サブユニットが「配列表の配列番号：1のアミノ酸の36番目を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する」ものであるニトリルヒドラターゼに関する部分、及び、請求の範囲2-6、10-17、23-34、41-43及び45-55に記載された発明のうち、 $\alpha$ サブユニットが「配列表の配列番号：1のアミノ酸の36番目を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する」ものとなっている、若しくはそれに対応する塩基配列となっているものについてのみ国際調査報告を作成する。

## (第II欄の続き)

## ・ニトリルヒドラーゼ自体について

まず、請求の範囲1-12に記載された「 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットとを有するニトリルヒドラーゼ」についてまずみても、 $\alpha$ サブユニットについては、置換無し、36番目を置換したもの、71番目を置換したもの、・・・204番目を置換したものと、5種類のものが、 $\beta$ サブユニットについては、置換無し、10番目を置換したもの、32番目を置換したもの、・・・217番目を置換したものと、15種類のものが記載されている。つまり、少なくとも(5×15=)75種類のニトリルヒドラーゼが記載されているといえる。

ここで、それら75種類のニトリルヒドラーゼに発明の単一性があるというためには、それらが単一の一般的発明概念を形成するように関連している必要がある。換言すれば、それらの組合せどうしは、同一の「特別な技術的特徴」を含む技術的な関係を有していなければならない。そして、ここで言う、「特別な技術的特徴」とは、請求の範囲に記載された各発明が全体として「先行技術」に対して行う貢献を明示する技術的特徴のことである。(必要なら、特許協力条約に基づく規則13.2参照。)

しかし、本願優先日前に公知であった文献である「JP 9-275978 A (三井東圧化学株式会社) 1997.10.28」(以下、「参考文献」という。)には「 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットとを有するニトリルヒドラーゼ」であって、上述した部位とは異なる部位のアミノ酸が置換され、かつ、ニトリルヒドラーゼの機能を実質的に維持しているものが複数記載されているから、置換後もニトリルヒドラーゼの機能を実質的に維持しているということだけでは、「特別な技術的特徴」には該当しない。また、75種類のニトリルヒドラーゼが、参考文献には記載されていない改変方法(例えば、請求の範囲56に記載された改変方法)により得られたものであることは、75種類のニトリルヒドラーゼという「物質」が該改変方法以外では取得不可能なものとはいえない以上、「特別な技術的特徴」には該当しない。さらに、本願明細書の記載を参酌しても、それ以外の「特別な技術的特徴」(例えば、それら75種類のニトリルヒドラーゼ「全て」において、参考文献に記載されたニトリルヒドラーゼと比べて高い活性を維持している等の技術的特徴)の存在は確認も推認もできない。

してみると、上述した75種類のニトリルヒドラーゼは、単一の一般的発明概念を形成するように関連している一群の発明であるとはいえない。

請求の範囲13-55に記載された遺伝子、プラスミド等についても上述した75種類のニトリルヒドラーゼに係るものであるから、同様である。

## ・ニトリルヒドラーゼ活性を有する酵素の改変方法について

まず、請求の範囲56-71について考える。ニトリルヒドラーゼを改変することは参考文献にも記載されている、換言すれば、改変方法は既に記載されていると言えるので、該請求の範囲56-71に記載された改変方法に、単なる改変方法を越える、同一の「特別な技術的特徴」を含む技術的な関係を有していなければならない。

しかし、例えば、請求の範囲56に記載された発明と請求の範囲57に記載された発明は、改変を検討する際に参照すべき配列データ等が相違するものである。また、それと同様のことが、請求の範囲58-71についてもいえる。また、本願明細書の記載を参酌しても、それ以外の「特別な技術的特徴」の存在は確認も推認もできない。

してみると、請求の範囲56-71には、引用形式で記載された請求の範囲について考慮したとしても、請求の範囲56-71に記載された16種類の改変方法に係る発明が記載されていると言える。

請求の範囲72-77に記載された改変酵素等についても、上述した16種類の改変方法により得られたものとの特定があるのみであるから、同様である。

(続く)